Aus der Kinderklinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr.Dr.h.c. J. Ströder

ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ERSTMANIFESTATION RENALER VERÄNDERUNGEN BEI KINDERN MIT DIABETES MELLITUS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Dagmar Nebinger

aus Dortmund

Würzburg, den 8. Januar 1980

Aus der Kinderklinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr.Dr.h.c. J. Ströder

ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ERSTMANIFESTATION RENALER VERÄNDERUNGEN BEI KINDERN MIT DIABETES MELLITUS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Dagmar Nebinger

aus Dortmund

Würzburg, den 8. Januar 1980

Referent: Professor Dr. D. Gekle

Korreferent: Professor Dr.Dr.h.c. J. Ströder

Dekan: Professor Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 1980

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGEN

A. EINLEITUNG 1

Problemstellung 3

B. ZUR METHODE DER POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE 4

1. Prinzip 4
2. Anwendungsbereich 5
   a) Molekulargewichtsbestimmungen 5
   b) Reinheitsprüfungen 6
   c) Analysen 6
3. Anwendung zur Uroproteinanalyse 7
   a) Unterscheidung zwischen glomerulärer und tubulärer Proteinurie 7
   b) Proteinmuster bei Gesunden und verschiedenen Krankheiten 9
   c) Bisherige Beobachtungen bei diabetischer Nephropathie 11

C. METHODIK 13

1. Krankengut 13
2. Urinaufbereitung 13
3. 24-Stunden-Urinvolumen 14
4. Konzentration 14
5. Bestimmung der Proteinkonzentration mit einer modifizierten Lowry-Methode (nach Stauffer) 15
6. Probenpräparation 16
7. Gießen der Gele 16
8. Elektrophorese 18
9. Färbung mit Coomassieblue 18

Seite

10. Densitometrische Auswertung der Gele 19
a) Reproduzierbarkeit 19
b) Prinzip 19
11. Streubereich 20
12. Bestimmung der GTPR (glomerular-tubular-protein-ratio) 26

D. ERGEBNISSE 27

1. Proteinausscheidung (Bestimmung mit der Lowry-Methode) 27
a) Ausscheidung an Gesamtprotein in mg/24 Std. 27
b) Proteinausscheidung in mg/l 27
2. Abhängigkeit der Proteinausscheidung von der Einstellbarkeit des Diabetes mellitus 31
3. Auswertung der Densitogramme 33
a) Proteinbanden 33
b) GTPR (glomerular-tubular-protein-ratio) 33
c) Differenzierung der GTPR-Veränderungen im Verlauf des Diabetes mellitus 43

E. DISKUSSION 50

1. Gesamtproteinausscheidung 50
2. GTPR 52
3. Bewertung der einzelnen Proteingipfel 54

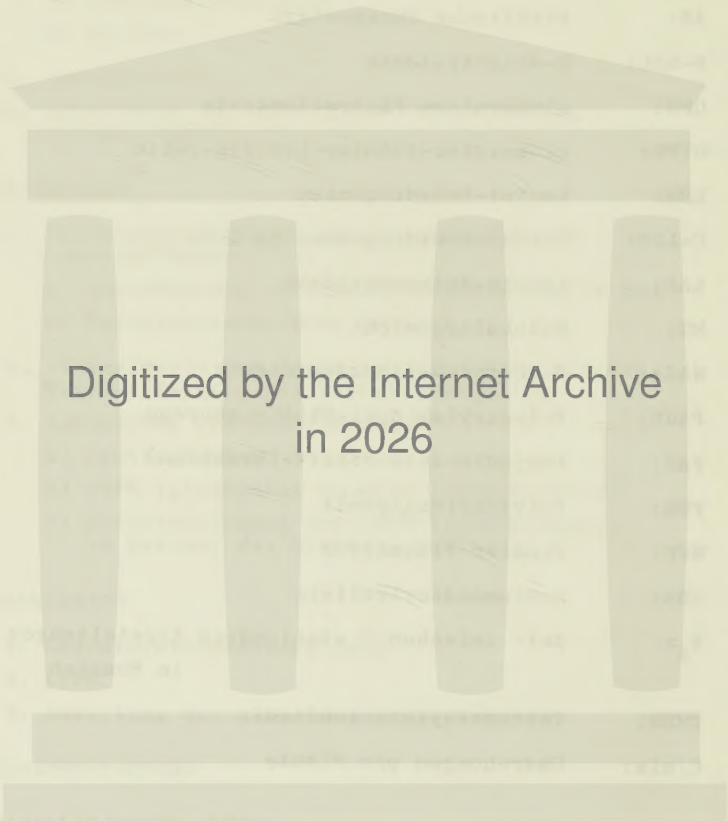
F. ZUSAMMENFASSUNG 59

G. TABELLARISCHER ANHANG 61

LITERATURVERZEICHNIS I - V

A B K Ü R Z U N G E N

AP:	alkalische Phosphatase
ß-GAL:	ß-Galactosidase
GFR:	glomeruläre Filtrationsrate
GTPR:	glomerular-tubular-protein-ratio
LDH:	Lactat-Dehydrogenase
U-LDH:	Lactat-Dehydrogenase im Urin
LAP:	Leucin-Aminopeptidase
MG:	Molekulargewicht
NAGA:	N-acetyl-ß-glucosaminidase
PAGE:	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAS:	Perjodic-Acid-Schiff-(Reaktion)
PEG:	Polyäthylenglykoll
RPF:	renaler Plasmafluß
SDS:	Sodiumdodecylsulfate
T_s:	Zeit zwischen 2 stationären Einstellungen in Monaten
TMED:	Tetramethyläthylendiamin
U/min:	Umdrehungen pro Minute



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0063

A. E I N L E I T U N G

Die vermehrte Eiweißausscheidung im Urin als krankhafter Befund war schon Hippokrates durch die veränderte Urinviskosität aufgefallen. Bis ins späte Mittelalter aber wurde diese Tatsache nicht mit einer Nierenveränderung in Verbindung gebracht. So weist GALEN nachdrücklich darauf hin, daß man bei eitrigem Harn nach der Körpergegend fahnden müsse, in der der Patient während seiner Krankheit Schmerzen empfunden habe.
"Denn bei allen haben wir erkannt, daß der Eiter durch die Nieren ausgeleert wird, nachdem sich vorher eine Eiteransammlung in der schmerzhaften Gegend gebildet hat." Er nimmt sogar an, daß kleine "haarähnliche Fleischstückchen" im Harn auftauchen können, ohne daß die Niere dabei beteiligt ist. Diese Auffassung von der fehlenden Mitbeteiligung der Nieren bei organischen Krankheiten hielt sich noch das gesamte 18. Jahrhundert hindurch. Es wurden nur Nephritis und Nephrolithiasis als autonome Erkrankungen der Niere anerkannt, nachdem MORGAGNI durch seine pathologisch-anatomischen Untersuchungen den Blick auf die verschiedenen Nierenveränderungen gelenkt hatte.

Eine Wende in der Geschichte der Nierenkrankheiten führte die 1827 erschienene Veröffentlichung von Richard BRIGHT über die nach ihm benannte Nephritis herbei. Er erkannte den Zusammenhang zwischen Albuminurie und renalen Erkrankungen. Der von ihm beschriebene "Morbus Brighti" wurde 1914 durch Theodor FAHR und Franz VOLLHARD genauer spezifiziert und als neue Nomenklatur die Begriffe Nephrosen, Nephritiden und Nephrosklerosen eingeführt, ein Schema, das viele Lehrbücher noch heute benutzen.

Es bestanden jedoch weiterhin die Schwierigkeiten, klinische und pathologische Gesichtspunkte völlig miteinander zur Dekkung zu bringen. Die Möglichkeit, mit der zuerst 1929 von

van SLYKE entwickelten Clearance-Methode die Funktion der einzelnen morphologischen Anteile zu prüfen, hat nicht zu einer vollbefriedigenden Lösung geführt, da der Kliniker es in vielen, meist fortgeschrittenen Fällen mit Formen zu tun hat, in denen Glomeruli und Tubuli gemeinsam betroffen sind.

Noch 1972 schreibt Johanna BLEKER in ihrem Buch "Die Geschichte der Nierenkrankheiten" (1) als Schlußwort: "Aber von unserem heutigen Standpunkt aus muß das Ziel, dem VOLLHARD und FAHR sich so nahe glaubten, nämlich Pathologie und Klinik der Nierenkrankheiten miteinander zur Deckung zu bringen, als erstrebenswertes, aber bislang noch unerreichtes Ziel betrachtet werden."

Allerdings sind in den letzten 2 Jahrzehnten erhebliche Fortschritte in der Analyse der Proteinurie, einem Kardinalsymptom der Nierenkrankheiten, gemacht worden, so daß ihre Größe nicht mehr das alleinige Kriterium für eine nur grobe Krankheitsdifferenzierung ist. Dies wurde durch neue Methoden der Proteinchemie und durch den Vergleich histologischer Veränderungen früher Stadien der Nierenerkrankungen durch die gleichzeitige Einführung von Nierenbiopsie und tierexperimentellen Modellen (5) erreicht.

Eine hervorragende Position bei der genauen Differenzierung verschiedener Proteinurien beginnt allmählich die Gelelektrophorese einzunehmen, da sie bereits eine Zuordnung beginnender Nierenschäden erlaubt, bevor mit einfachen Proteinbestimmungsmethoden überhaupt eine Proteinurie nachgewiesen werden kann. Gegen Mitte der 60er Jahre entwickelt, diente sie anfänglich hauptsächlich biochemischen Zwecken wie dem Reinheitsnachweis von Proteinen und deren Isolierung. Bei der Wahl geeigneter Gelkonzentrationen und idealer pH-Werte kann eine optimale Auftrennung von Eiweißgemischen erreicht werden.

Als man zu Beginn dieses Jahrzehnts begann, Proteinmuster im konzentrierten Urin bei verschiedenen Nierenerkrankungen zu untersuchen und mit den pathologisch-anatomischen Ergebnissen zu vergleichen, gelang eine klare Trennung von glomerulären und tubulären Veränderungen.

Problemstellung

Bisher war man vielfach der Ansicht, daß Nierenveränderungen bei jugendlichen Diabetikern erst nach langer Krankheitsdauer und Insulintherapie einsetzen. Nur wenige Untersuchungen aus der Pathologie beschreiben Veränderungen schon kurz nach Krankheitsmanifestation, messen ihnen aber keinen Krankheitswert zu.

In der vorliegenden Arbeit soll erstmals an einem größeren Kollektiv untersucht werden, ob ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Diabetesdauer und einer zu erwartenden Änderung des molekulargewichtsabhängigen Proteinmusters der Uroproteine bei kindlichen Diabetikern zu finden ist.

Außerdem soll ein möglicher Zusammenhang zwischen Uroproteinausscheidung und der Art und Dauer der Insulintherapie aufgedeckt werden, unter besonderer Berücksichtigung der Qualität der Blutzuckereinstellung.

B. ZUR METHODE DER POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE

1. Prinzip

Bringt man Proteine bei einem pH-Wert > 7 auf ein Trägermedium, an das ein elektrisches Feld gelegt werden kann, so wandern die Proteine entsprechend ihrer Ladung unter diesen Bedingungen vom negativen zum positiven Pol des elektrischen Feldes. Dieser Vorgang wird als Elektrophorese bezeichnet.

Bei der Polymerisation von Acrylamid unter Zusatz eines Quervernetzers entsteht ein dreidimensionales Maschenwerk (24). Die Polymerisation entsteht durch Zugabe eines radikalbildenden Systems. Die entstehenden Gele sind glasklar, das Maschenwerk bildet eine konstante Porenweite, die durch Variation der Konzentration der Ausgangssubstanzen den zu trennenden Molekülen angepaßt werden kann (25,17).

Beim Anlegen eines elektrischen Feldes an das Polymer sollten die auf dem Träger befindlichen Proteine um so schneller zum positiven Pol wandern, je höher ihre negative Ladung ist. Um die Eigenladung der Proteine zu überdecken und um eine einheitliche räumliche Struktur der Proteine zu erhalten, behandelt man diese vor dem Aufbringen mit Natriumdodecylsulfat (engl. Sodiumdodecylsulfate = SDS). SDS, ein Detergenz mit einer apolaren Kohlenstoffkette und einem polaren Sulfatrest, lagert sich mit seinem Kohlenstoffskelett an apolare Bereiche des Proteins an. Diese Wechselbindung ist so stark, daß sie während der Elektrophorese nicht aufgehoben wird. Der Sulfatrest liegt praktisch immer mit einer negativen Ladung vor ($pK \approx 1$). So wandern die negativ geladenen SDS-Protein-Mizellen nur in Abhängigkeit ihrer verschiedenen Molekulargewichte unterschiedlich weit (44,31), wobei die kleinsten Moleküle am weitesten wandern, was durch den Siebeffekt des Gels bedingt ist, der über die Ladung do-

miniert. Dabei korreliert die Wanderungsstrecke mit dem Molekulargewicht. Eine Linearetät bei halblogarithmischer Auftragung des Verhältnisses Wanderungsstrecke zu Molekulargewicht konnte von SHAPIRO (40), der als Erster die Methode zur Molekulargewichtsbestimmung ausbaute, für den Bereich von 15 500 bis 165 000 Dalton, später von WEBER (45) für ungefähr denselben Bereich bewiesen werden. Für höhere Molekulargewichte erwies es sich als zweckmäßig, ein Gel mit einem Gradienten der Polyacrylamid-Konzentration zu gießen (22). Hierbei konnte eine Trennung von 10 000 bis 1 Million Dalton vorgenommen werden.

2. Anwendungsbereich

a) Molekulargewichtsbestimmungen

Da nun zwischen der Wanderungsstrecke der Proteine und ihrem Molekulargewicht eine lineare Beziehung für einen bestimmten Bereich nachgewiesen wurde (45,40,22), bot sich diese Methode zur Bestimmung unbekannter Proteine an. Man läßt zu diesem Zweck einen Standard bekannter Proteine mitlaufen, aus dessen Wanderungsstrecken dann eine Eichkurve erstellt wird. Da die Gele kleine Längendifferenzen aufweisen, trägt man jeweils das Verhältnis Wanderungsstrecke zu Gellänge auf. Aus dieser Eichkurve läßt sich dann das Molekulargewicht direkt ablesen. Bei wiederholten Durchläufen ergab sich eine Variation in den Wanderungsstrecken von $\pm$ 3 % (45) bei sonst gleichen Bedingungen. Sehr dicht beieinanderliegende Proteine können also nur in Gelen genau definiert werden, die auf Grund ihrer Porenweite diesen Bereich stark auseinanderziehen. Im allgemeinen kommt es aber mehr auf das ungefähre Molekulargewicht an, um weitere spezifische Untersuchungen anzuschließen.

b) Reinheitsprüfungen

Die Methode bietet sich ideal für Reinheitsuntersuchungen eines Proteins an. Der Reinheitsgrad ist leicht an der Anzahl und der Schärfe der dargestellten Proteinbanden zu ersehen. So finden sich z.B. bei Insulin häufig Hinweise auf Pankreaszellmembranreste (24).

c) Analysen

Anwendungsbeispiele dieser schnellen und exakten Methode füllen umfangreiche Handbücher. In der Folge sollen daher nur die wichtigsten klinischen Anwendungsbereiche erwähnt werden:

aa) Trennung von Iso-Enzymen (z.B. LDH) (14)

bb) Serumproteine

Eine einzige Elektrophorese erlaubt die quantitative Erfassung von saurem α_1-Glykoprotein, Transferrin, Haptoglobin, α_2-Makroglobulin, ß-Lipoprotein sehr präzise sowie die von Gc-Protein, Coeruloplasmin, α_1-Antichymotrypsin, Hämopexin, Inter-α-Trypsin-Inhibitor und $ß_1$A-Globulin etwas weniger genau (17). Sowohl die Haptoglobine als auch die Gc-Proteine treten in Form charakteristischer, genetisch bedingter Bandenmuster auf. Lage und Zahl der Haptoglobin-Banden erlauben eine eindeutige Zuordnung des Serums zum genetischen Typ Hp 2-2, Hp 2-1 oder Hp 1-1 sowie der genetischen Gc-Typen 1-1, 2-1, 2-2. Außerdem kann die Gesamtmenge der γ-Globuline ziemlich gut ermittelt werden und auch ungefähr der Anteil von γA, γG und γM.

Besonders eindeutig sind Paraproteine zu erkennen, weswegen Paraproteinämien ohne klinisch gesichertes Plasmocytom mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese überwacht werden sollten. Bei verschiedenen Krankheiten verändern sich die Serumproteinspiegel in charakteristischer Weise, so steigen z.B. die Haptoglobine bei Neoplasmen, während sie bei Zerstörung des Lebergewebes absinken (24,17).

cc) Analysen anderer Körperflüssigkeiten

Die wichtigste Flüssigkeit nach dem Serum dürfte für Untersuchungszwecke der Urin sein, auf den in Punkt 3 eingegangen wird. Untersucht wurde aber auch Liquor, der sich bei vielen Krankheiten verändert zeigte, z.B. bei Meningitis, Tumormetastasen im Hirn, progressiver Paralyse und Schizophrenie (24). Im Prinzip ist die Untersuchung aller Körperflüssigkeiten, Exsudate und Transsudate möglich, nur ergeben sich oft keine speziellen Hinweise für Diagnose und Therapie.

3. Anwendung zur Uroproteinanalyse

a) Unterscheidung zwischen glomerulärer und tubulärer Proteinurie

Untersuchungen der Uroproteine haben bisher den Nachteil, daß der Urin auf Grund der geringen Proteinkonzentration erst einer Vorbehandlung bedarf. Während der Sammelperiode sollte ein Bakterienwachstum vermieden werden. Außer einer Konzentration ist eine Dialyse nötig, um den Einfluß der Salze auf Ladung und Wanderungsgeschwindigkeit auszuschalten. Erst der gereinigte, konzentrierte Urin gibt gleich scharfe und kräftige Banden.

Die Ausscheidung von Proteinen in den Urin wird entsprechend der jeweiligen Pathogenese in renale, prä- und postrenale Formen unterschieden (3). Die meisten Proteine dürften aus dem Serum stammen, da Albumin, Transferrin und γ-Globulin überwiegen, aber es werden auch Proteine mit kleinerem Molekulargewicht ausgeschieden (33). Dabei scheint das Molekulargewicht das entscheidende Kriterium für ihre Behandlung durch die Niere zu sein.

Die Glomerulummembran besteht aus drei Schichten: dem Endothel, der Basalmembran und den Epithelzellen. Elektronenoptische Untersuchungen (Lit. s. 12) haben gezeigt, daß die

mittlere Schicht, nämlich die Basalmembran, die determinierende Filtrationsbarriere sein muß. Sie zeigt ein Porenmuster, dessen Porenäquivalente einer Normalverteilung unterliegen mit einem mittleren Porenradius von 29 ± 10 Å. Für Albumin ist etwa ein Fünftel der Poren durchlässig (10,11, 12). Insgesamt können Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 150 000 Dalton durch die Membran treten. Sie werden durch Pinocytose von distalen Nephronabschnitten reabsorbiert und erscheinen nicht im Endharn. Der gleiche Mechanismus gilt anscheinend auch für kleinere Proteine, nur ist bei diesen die glomeruläre Clearance höher. Der Ort der zellulären Aufnahme im proximalen Tubulus ist unklar, vor allem aber auch, ob für verschiedene Proteine unterschiedliche Resorptionsmechanismen stattfinden, d.h. ob eine selektive Resorption möglich ist (4). Nach Aufnahme in die Tubuluszelle werden die Proteine wahrscheinlich zu Aminosäuren katabolisiert.

Ist nun dieser Mechanismus an einer Stelle gestört, da die Niere auf Grund einer Schädigung ihre normale Funktion nicht mehr erfüllen kann, treten vermehrt Proteine in den Endharn über. Diese Proteine kann man mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter Zusatz von SDS nach ihren Molekulargewichten trennen und so glomeruläre von tubulären Proteinurien unterscheiden. Bei glomerulären Schäden findet man eine Ausscheidung der Proteine MG > Albumin (Transferrin 88 000, Globuline 150 000 - 900 000), bei tubulärem Schaden Proteine MG < Albumin ($ß_2$-Mikroglobulin 13 000, Retinol-bindendes Protein 21 000, Lysozym 14 000) (32). Albumin wird ausgeklammert, da es in beiden Fällen erhöht ist (2).

Zur Auswertung bildet man die GTPR (glomerular-tubular-protein-ratio), d.h. das Verhältnis der Proteine > Albumin zu denen < Albumin.

Abzugrenzen von der glomerulären Form ist die postrenale Proteinurie, die oft durch Entzündungen der ableitenden Harnwege mit Immunglobulinproduktion entsteht. Hierbei sind aber diejenigen Proteine nicht oder nur gering nachzuweisen, die

nicht am Entzündungsprozeß beteiligt sind (z.B. Transferrin). Bei prärenalen Proteinurien wird meist nur ein einzelnes Protein vermehrt ausgeschieden, dessen Molekulargewichtsbestimmung die Diagnose erlaubt (z.B. Bence-Jones-Ig-L-Ketten bei Myelom, Myoglobin bei Muskeltrauma) (3,5).

b) Proteinmuster bei Gesunden und verschiedenen Krankheiten

Bei Normalpersonen wurde eine Proteinausscheidung zwischen 10 und 210 mg/l gefunden (15,34), die Mehrzahl liegt zwischen 20 und 30 mg pro Tag. Diesen Wert erreichen auch Kinder ab dem 13. Lebensjahr, während Kleinkinder und Schulkinder deutlich niedrigere Werte aufweisen (6 - 8 mg/Tag), Neugeborene und Säuglinge dazwischenliegen (12 - 15 mg/Tag) (9). Dabei liegen die Werte der Mädchen jeweils etwas höher, was aber auch durch die Beimengung von Proteinen und Mucopeptiden aus dem äußeren Genitale bedingt sein könnte.
Trennt man die Proteine aus dem Urin Gesunder mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf, so findet man hauptsächlich Albumin (30 - 40 %) (8,31), daneben eine diffuse Verteilung höherer und niedrigerer Proteine.

Bei Nierenschäden läßt sich ein ganz charakteristisches Ausscheidungsmuster der Proteine nachweisen, das man nach dem Molekulargewicht der hauptsächlich ausgeschiedenen Proteine einteilen und auf bestimmte histologische Veränderungen beziehen kann:

aa) Glomeruläre Proteinurien (Uroproteine hauptsächlich MG > 60 000)

Dabei unterscheidet man
1) unselektive glomeruläre Proteinurien (60 000 - 1 000 000), bei denen ein Schaden der Basalmembran und des Mesangium vorliegt. Sie finden sich bei Glomerulonephritis, mesangialproliferativer Glomerulonephritis, diabetischer Glomerulosklerose, Arterio-Arteriolosklerose und Amyloidose (37).

2) Selektive glomeruläre Proteinurien (60 000 - 100 000); sie kommen vor allem bei Nephrotischem Syndrom (bei "Minimal Change"-Nephritis) vor. In Biopsien findet man eine Podozytenverschmelzung der Zellen des glomerulären Epithels (35).

bb) Bei tubulären Proteinurien (Uroproteine hauptsächlich Molekulargewicht < 70 000) liegt der Schaden im proximalen Tubulus, doch scheint es auch hier zwei selektive, molekulargewichtsbezogene Reabsorptionsmechanismen zu geben:
1) Eine komplexe Tubulusschädigung läßt alle Moleküle von 10 000 bis 70 000 passieren und findet sich vor allem bei entzündlichen Erkrankungen (37), hier verbunden mit einer kleinen glomerulären Proteinurie. Reine tubuläre Proteinurien finden sich nur bei kongenitalen Tubulopathien, sind also recht selten. Temporär findet man sie bei akutem Nierenversagen und nach Nierentransplantation, jedoch auch ohne Nierenversagen bei Schwermetallvergiftungen, unter tubulotoxischer Medikation und bei akuter Pankreatitis (5). Ein obligater Befund ist sie bei allen terminalen Niereninsuffizienzen etwa ab 5 mg/100 ml Serum-Kreatinin.
2) Man findet außerdem eine partielle tubuläre Proteinurie im Bereich von 40 000 bis 70 000, bei der man nur eine Teilschädigung des Tubulus vermutet. Sie wird selten isoliert, meist verbunden mit einer unselektiven glomerulären Proteinurie bei vaskulärer Nephrosklerose und im Frühstadium der diabetischen Nephropathie gefunden (37,5). Nach Nierentransplantation persistiert oft nach einer großen (bis 6 000 mg/Tag) tubulären Proteinurie eine rudimentäre tubuläre Exkretion zwischen 40 000 und 70 000, wohl als Zeichen ischämischer Tubulusschädigung bei Kadavernieren. Hier ist das erneute Auftreten der tubulären Proteinurie vom MG 10 000 - 70 000 im Transplantationsverlauf als Zeichen für eine Abstoßungskrise mit interstitiellen Veränderungen zu werten (3).

Bei Fieber fand man eine tubuläre Proteinurie bei allen Patienten, bei einem Teil auch eine glomeruläre (16). Da nach Normalisierung der Temperatur die tubuläre Proteinurie schnell bei allen Patienten verschwand, nimmt man an, daß sie durch das Fieber bedingt wurde. Die glomeruläre Proteinurie sistierte bei der Hälfte, weswegen sie als Immunantwort auf das infektiöse Agens angesehen wurde.

Im allgemeinen ist die Methode also wenig krankheitsspezifisch (38). Abgesehen von prärenalen Proteinurien, bei denen die Ausscheidung eines bestimmten Einzelproteins dominiert, lassen die 4 Einteilungen der renalen Proteinurie jeweils eine Fülle von Möglichkeiten offen, wobei außerdem noch eine Änderung im Proteinmuster je nach verschiedenen Krankheitsphasen beobachtet wird (38). Hat man aber einmal die Veränderung des Proteinmusters auf eine bestimmte Krankheit bezogen, so eignet sich die Methode besonders zur Verlaufsbeobachtung.

c) Bisherige Beobachtungen bei diabetischer Nephropathie

Molekulargewichtsbezogene Untersuchungen von Uroproteinen bei Diabetes mellitus wurden bisher nur an wenigen Patienten und hauptsächlich in Stadien mit manifester Nephropathie durchgeführt. Im Frühstadium der diabetischen Nephropathie findet sich eine selektive tubuläre Proteinurie vom Molekulargewicht 40 000 - 70 000, verbunden mit einer unselektiven glomerulären Proteinurie (31,4,5). Die Schädigung muß in den distalen Abschnitten des proximalen Tubulus angenommen werden, denn schon 1933 konnte gezeigt werden, daß kleine Moleküle proximaler resorbiert werden als große (Lit. s. 4). Die beiden Resorptionsmechanismen für kleine Moleküle scheinen unterschiedlich empfindlich zu sein, denn nach akuten Schädigungen (akutes Nierenversagen, Nierentransplantation) verschwinden zuerst die kleinsten Proteine (MG < 40 000) aus dem Harn, sobald eine klinische Bes-

serung eintritt (4). Man muß also die Ausscheidung von Proteinen des Molekulargewichts 40 000 - 70 000 als Frühmanifestation der diabetischen Nephrosklerose ansehen.

Im Spätstadium der diabetischen Nephropathie wandelt sich das Proteinmuster zu einer bevorzugten Ausscheidung glomerulärer Proteine. Dabei findet man das Muster einer unselektiven glomerulären Proteinurie schon bei Eiweißausscheidung unter 50 - 100 mg/Tag, so daß sich hier ein sehr früher Nachweis beginnender spätdiabetischer Nierenveränderungen anbietet (5). Der Schaden dürfte in einer Verschmelzung der Podozyten, die eine Zytoplasmaschicht über die Basalmembran ziehen, und in einer Schädigung der Basalmembran selbst liegen.

C. METHODIK

1. Krankengut

Untersucht wurden 40 Diabetiker (28 Jungen, 12 Mädchen), 14 gesunde Vergleichskinder (5 Jungen, 9 Mädchen) sowie ein Kind mit akuter diffuser Glomerulonephritis, um spezifische Veränderungen der Proteinbanden belegen zu können.

In Voruntersuchungen konnte keine Sexotropie festgestellt werden, daher werden im folgenden beide Gruppen stets gemeinsam ausgewertet. Es wurde streng darauf geachtet, daß keines der Kinder eine Nierenerkrankung hatte.

Durchschnittsalter

Das Durchschnittsalter betrug:

Gesunde:	8,9 Jahre	(9/12 Jahre bis 14 9/12 Jahre)
Diabetiker:	10,0 Jahre	(1 5/12 Jahre bis 15 3/12 Jahre)

Manifestationsalter

Wie auch von vielen anderen Autoren berichtet, wurde eine starke Betonung der Wachstumsphasen gefunden (3. Lebensjahr, bei Schulbeginn und in der Präpubertät).

2. Urinaufbereitung

Gesammelt wurde jeweils der 24-Stunden-Urin in 2 000 ml - Sammelgefäßen. Zum Ausschluß des Bakterienwachstums befand sich in jeder Flasche 0,5 g Natriumacid, was bei einem Urinvolumen von 1 000 ml einer Konzentration von 0,05 % Natriumacid entspricht. Das Gesamtvolumen wurde gemessen und filtriert, davon wurden je 100 ml bei -20°C tiefgefroren.

3. 24-Stunden-Urinvolumen

Das Urinvolumen der Diabetiker lag mit 1 157 ± 86 ml ($\bar{x}$ ± SE) deutlich über dem Gesunder (636 ± 174 ml), wobei nur 9 Fälle unterhalb des Normaldurchschnitts lagen. Dies ist auf die osmotische Diurese zurückzuführen.

4. Konzentration

Nach dem Auftauen wurde jede Urinprobe für 10 Min. bei 3 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde konzentriert:

a) durch Dialyse in Polyäthylenglykoll 20 000 (Serva) ("PEG")
Pro Patient wurden 50 ml Urin in "Visking"-Schläuchen (Serva) gegen 20 - 60 % PEG-Lösung bis auf ein Endvolumen von ungefähr 1 ml konzentriert und dialysiert.

Herstellung: Puffer Tris (hydroxymethylaminomethan)-HCl pH 7,4 + 0,05 % Na-acid

Mengen für 5 l:
- 60,5 g Tris-HCl in 1 l H_2O lösen
- mit konzentriertem HCl auf pH 7,4 einstellen
- auf 5 l mit H_2O verdünnen
- Zugabe von 2,5 g Na-acid
- Zugabe von 1,5 kg PEG (entspricht 30 %)

Dialyse im Kühlraum bei 4°C.
Das Restvolumen (ungefähr 0,5 ml) wurde mit einer Pasteurpipette entnommen, dabei erwies es sich als zweckmäßig, einige Tropfen Puffer durch den leeren Schlauch laufen zu lassen, um evtl. an der Membran haftende Proteine zu lösen. In einem Eppendorf-Gefäß wurde das Konzentrat mit Puffer auf 1 ml gebracht (entspricht 50-facher Konzentration) und bei -20°C eingefroren.

b) durch Ultrafiltration (Minicon B_{15}, Fa. Amicon)
In die Kammer wurden zweimal je 5 ml Urin gegeben und bis zur 25-Marke konzentriert (entspricht 50-facher Konzentration).

Die Proben wurden mit einer Pasteur-Pipette entnommen und in Eppendorf-Gefäßen bei -20°C eingefroren.

5. Bestimmung der Proteinkonzentration mit einer modifizierten Lowry-Methode (nach Stauffer) (42)

Reagentien: Alkalischer Puffer: 1 M Na_2CO_3 in 0,25 M NaOH
Kupfer-Reagenz: 0,1 % $CuSO_4 \times 5\ H_2O$; 0,2 % Na-K-Tartrat
Folin-Reagenz (Merck): 1 : 3 verdünnt mit H_2O (immer frisch!)

Ausführung: Leerwert: 1 ml H_2O
Probe (Standard): 50 µl + 950 µl H_2O
zu jedem ml Lösung + 1 ml alkal. Puffer
+ 0,4 ml Kupferreagenz

mischen, 10 Minuten stehen lassen

+ 0,75 ml Folin-Reagenz

mischen, 10 Minuten stehen lassen

Ablesen der Extinktion am Spektralphotometer bei OD 700 nm gegen Leerwert, ab Extinktion 0,4 Probe verdünnen. Umrechnung der Extinktion in mg Protein / 50 µl Probe mit Hilfe einer Eichkurve mit einem Proteinstandard (5 g% Albumin + 3 g% Globulin).

Aus dieser Probenkonzentration wurde die Konzentration im Eppendorf-Gefäß berechnet, daraus die Gesamtproteinausscheidung pro Tag.

Rechenbeispiel:
Urinvolumen 500 ml
Eppendorf-Volumen 1 ml (50-fache Konzentration aus 50 ml Urin)
Beträgt nun die Konzentration im Eppendorf-Gefäß 2 mg/ml, so

entspricht dies einer Proteinmenge von 2 mg (bei 1 ml Volumen).
Diese 2 mg Protein waren also in 50 ml Urin enthalten, im Gesamturin befanden sich also $\frac{2 \text{ mg}}{50 \text{ ml}} \cdot 500 \text{ ml} = 20 \text{ mg}$ Protein.
Gesamtproteinausscheidung: 20 mg/24 Std. oder 40 mg/l.

6. Probenpräparation

100 µl Urinkonzentrat wurden mit 20 µl Phosphatpuffer (pH 7,2, 0,01 M + 2 % SDS) (Sodiumdodecylsulfate) versetzt. und 5 min bei 95°C inkubiert.
Danach Zugabe von 20 µl Glyzerin/Bromphenolblaulösung (Mischung von Glyzerin und Bromphenolblau, etwa so, daß die Lösung nach 10 min Rühren gesättigt ist).
Von diesem Gemisch wurde so viel aufgetragen (je nach Proteingehalt der Ausgangslösung), daß ungefähr 100 µg Protein auf dem Gel waren.

Rechenbeispiel:
Proteingehalt der Ausgangslösung 3 mg/ml ≙ 3 000 µg/ml
≙ 300 µg/100 µl
100 µl · 300 µg = 140 µl · X µg
X = 214 µg
⇒ 100 µl enthalten 214 µg
100 µg befinden sich in $\frac{100 \cdot 100}{214} = 46$ µl

Es müssen also 46 µl Proteingemisch aufgetragen werden.

7. Gießen der Gele

A) Reagentien

a)	Separationsgel	22,2 g Acrylamid 0,6 g Methylenbisacrylamid	auf 100 ml H_2O gelöst
b)	Spacergel	22,2 g Acrylamid 4,0 g Methylenbisacrylamid	auf 100 ml H_2O gelöst

Beide Lösungen filtern und bei 4°C aufbewahren.

c) Tetramethyläthylendiamin (TMED)

d) Ammoniumperoxidisulfat (Initiator, immer frisch)
15 mg/ml H_2O

e) Gelpuffer Phosphat-Puffer 0,2 M pH 7,2

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	7,8 g	} in 1 l H_2O lösen
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	38,6 g	
SDS	2,0 g	

Falls erforderlich, pH-Korrektur mit 96 %iger Phosphorsäure.

f) Reservoirpuffer für die Elektrophoresekammer
Obiger Gelpuffer 1 : 1 verdünnt mit H_2O
(für 0,2 % SDS sind dann 4 g nötig!)

B) Mischungsverhältnisse, Arbeitsanweisung

a) Separationsgel (7,5 % Acrylamid)

Acrylamidlösung a	10,1 ml
H_2O	3,4 ml
Gelpuffer	15,0 ml

schütteln (cave Luftblasen)

Ammoniumpersulfat	1,5 ml
TMED	0,045 ml

Sofort auf die gewaschenen Röhrchen im Gelständer (unteres Ende im Gummi erst mit Parafilm verschließen) je 1,7 ml aufbringen und mit 25 µl H_2O überschichten (um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten).
30 Minuten polymerisieren lassen.

b) Spacergel (5 % Acrylamid, 20 % Bisacrylamid am Gesamtacrylamid)

Acrylamidlösung b	6,75 ml
H_2O	6,75 ml
Gelpuffer	15,0 ml

schütteln

Wasser mit schmalen Filterpapierstreifen entfernen

Ammoniumpersulfat	1,5 ml
TMED	0,045 ml

Davon je 0,2 ml vorsichtig auf das Separationsgel auftragen und besonders vorsichtig mit je 25 µl H_2O überschichten. 45 Minuten polymerisieren lassen.

8. Elektrophorese

Ausführung mit einem Desaga-Diskelektrophorese-System 14 600 und einem Desaga-Netzgerät.
Röhrchen in Halterung geben, obere und untere Kammer mit Reservoirpuffer füllen.
Vorelektrophorese mit 2 mA/Gel für 15 Minuten.
Anschließend werden mit einer Hamilton-Spritze entsprechende µl Protein/SDS/Bromphenolblau (≙ 100 µg Protein) aufgetragen.
Elektrophoresebeginn: 1 mA/Gel für 1 Stunde.
Elektrophorese: 4 - 7 mA/Gel (bis Bromphenolblau am unteren Rand des Röhrchens angelangt ist).

Entnahme der Gele aus den Röhrchen: Mit einer feinen, stumpfen Kanüle vorsichtig Wasser zwischen Gel und Röhrchen spritzen, bis das Gel leicht herausgleitet.

9. Färbung mit Coomassieblue 45 Minuten

1,25 g Coomassieblue (Serva)
227 ml Methanol
46 ml Eisessig
} mit H_2O auf 500 ml gebracht

Entfärbung in Entfärberlösung

50 ml Methanol
75 ml Eisessig
} mit H_2O auf 1 l gebracht

Entfärbedauer: 4 Tage mit häufigem Entfärberwechsel
Aufbewahrung in 7,5 %iger Essigsäure in dünnen, gut verschlossenen Reagenzgläsern.

10. Densitometrische Auswertung der Gele

Die Auswertung der gefärbten Gele erfolgte mit einem Densitometer und Scanner der Fa. Instrumentation Specialities (Modell UA 4, Filter 580 nm = Absorptionsmaximum von Coomassieblue).

Dabei ergaben sich entsprechend der Wanderungsstrecke der Proteine und ihrer absoluten aufgetragenen Menge verschiedene Gipfel.

a) Reproduzierbarkeit

Um die Genauigkeit der Methode zu prüfen, wurden von jeder Urinprobe 2 bis 3 Gele beschickt. Sofern diese in einem Durchlauf der Elektrophorese zusammen hergestellt wurden, ergaben sich identische Ergebnisse, bei 2 verschiedenen Durchläufen zeigten sie im Prinzip dasselbe Bild, waren aber innerhalb eines Streubereiches gegeneinander verschoben, da es nicht gelingt, die Proteine immer 100 %ig gleich weit laufen zu lassen (Ursache und Streubereich siehe Punkt 11).
Bei der densitometrischen Auswertung der Gele ergaben sich für dieselbe Probe stets identische Ergebnisse, auch bei wiederholten Versuchen an verschiedenen Tagen.
Die Ergebnisse bei Minicon B_{15}-Konzentration und PEG-Konzentration desselben Urins waren nicht immer gleich, so daß man einen Proteinverlust bei Minicon B_{15}-Konzentration annehmen muß, der manchmal so weit ging, daß die Probe nicht ausgewertet werden konnte.
Ein weiterer Unterschied lag im Bereich der Albuminbande, die bei PEG-Konzentration oft sehr breit wurde. Diese Bande wurde bei Minicon B_{15}-Konzentration in eine breite und eine schmale Bande unterteilt. Sofern es also möglich wäre, den Urin mit der Minicon-Methode stärker als 50-fach zu konzentrieren und trotzdem ein Endvolumen von mindestens 0,2 ml zu erhalten, ist die Methode, vor allem wegen des geringen Arbeits- und Zeitaufwandes, durchaus zu empfehlen. Sie wird nur unbrauch-

bar, wenn bei einer fast normalen Proteinausscheidung ein hohes Urinvolumen vorliegt (also bei einer geringen Proteinausgangskonzentration), wie es z.B. bei Beginn eines Diabetes mellitus häufig der Fall ist.

b) Prinzip

Da bei jeder Elektrophorese die Proteine in ihrer Wanderungsstrecke etwas variieren, mußte eine Methode gefunden werden, um die Werte zu normieren und gemeinsam auswerten zu können.

Bei jedem Elektrophoreselauf (maximal 14 Gele) wurden 13 Diabetiker oder Vergleichskinder und 1 Eichproteingemisch aufgetragen. Durch den Vergleich mit diesen bekannten Proteinen konnte bei jedem Lauf zumindest die Albuminbande mit Sicherheit bestimmt werden, die restlichen Proteine anhand einer Eichkurve in bestimmte Molekulargewichtsklassen eingeteilt werden. (Abb. 1)

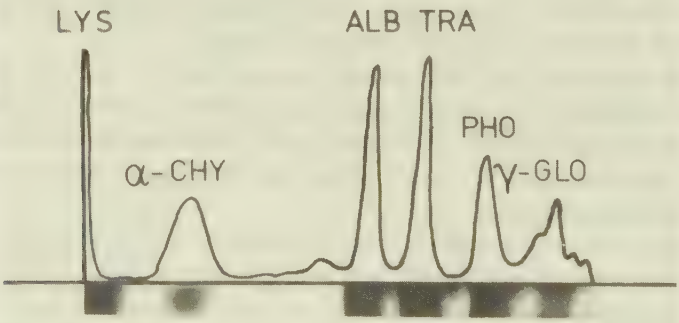


Abb. 1: Gel und Densitogramm der Eichproteinmischung. Das Molekulargewicht nimmt von links nach rechts zu. Links vom Albumin tubuläre Proteine, rechts glomeruläre.

Die Proteine des Gemisches waren vorher in einem gesonderten Lauf einzeln aufgetragen worden. Anhand ihrer Wanderungsstrecke wurde eine halblogarithmische Eichkurve aufgestellt. Zum Beweis der angegebenen Linearität diene folgende Eichkurve: (Abb. 2)

Verwendete Proteine	MG	$\frac{\text{Wanderungsstrecke}}{\text{Gellänge}}$
γ-Globulin	156 000	0,08
Phosphorylase b	100 000	0,22
Transferrin	88 000	0,34
Albumin	69 000	0,425
α-Chymotrypsin	25 000	0,785
Lysozym	14 000	1,0

Ordinate: log MG

Abszisse: $\frac{\text{Wanderungsstrecke (cm)}}{\text{Gellänge (cm)}}$, um die nie genau gleich langen Gele zu normieren.

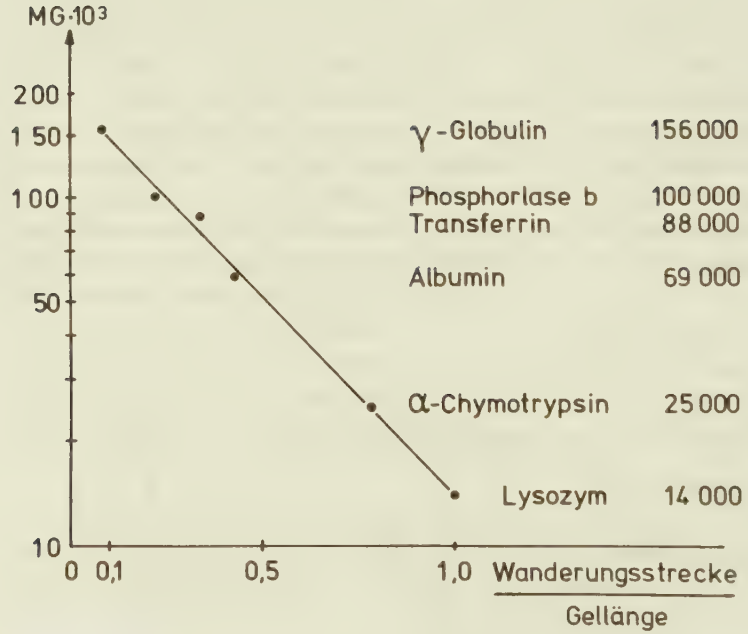


Abb. 2: Eichkurve (Abszisse: Wanderungsstrecke/Gellänge, Ordinate: log Molekulargewicht). Man bekommt bei halblogarithmischer Darstellung eine lineare Verteilung der Eichproteine.

Nimmt man die Einzelproben nur zur Identifizierung des Proteins und mißt die Wanderungsstrecke aus der Kurve des Proteingemisches oder vom Gel direkt ab, genügt als Abszisse die Laufstrecke in cm. (Abb. 3)

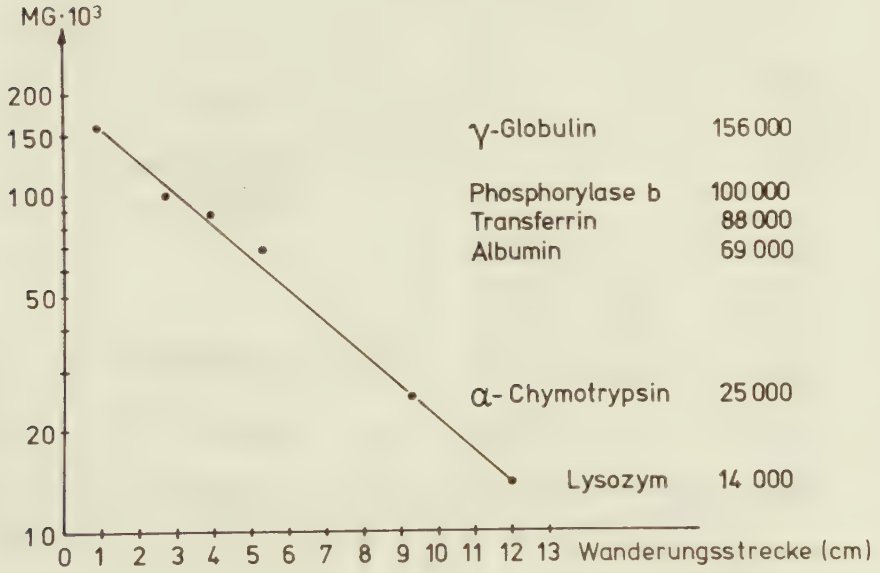


Abb. 3: Eichkurve (Abszisse: Wanderungsstrecke (cm), Ordinate: log MG); hierbei wurden die Wanderungsstrecken der Eichproteine aus einem Gel bestimmt. Lineare Verteilung.

Um bei der anschließenden Auswertung die ausgeschnittenen Kurven direkt anlegen zu können (zur Bestimmung des kleinsten und größten erfaßten Proteins, der auszuschneidenden Albumin-Bande und einzelner Protein-Banden), wurde bei der folgenden Eichkurve die Ordinate auf die Abszisse projiziert. (Abb. 4)

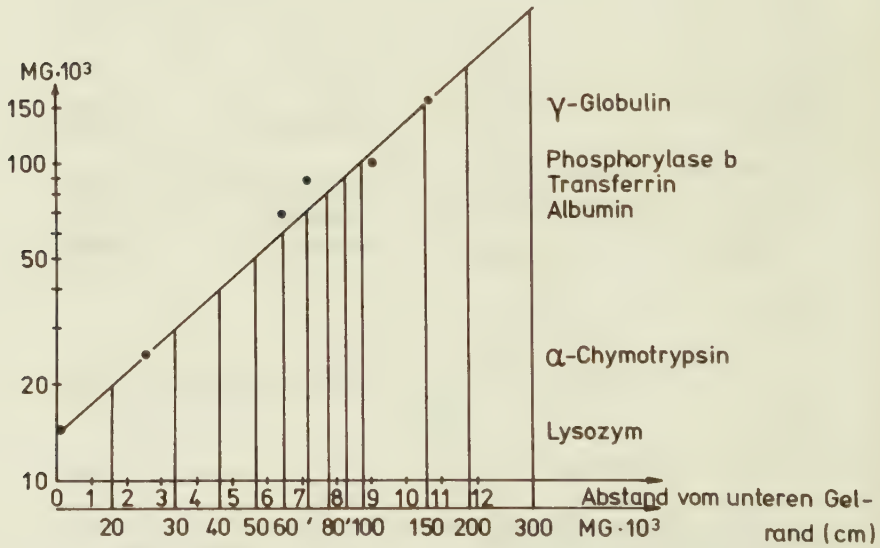


Abb. 4: Umgearbeitete Eichkurve zum direkten Anlegen der ausgeschnittenen Kurven. Der Logarithmus des Molekulargewichts wurde auf die Abszisse projiziert.

11. Streubereich

Zur weiteren Bestimmung wurden die Kurven auf Spezialtransparentpapier übertragen und ausgeschnitten. Dabei galt als Grundlinie eine Tangente an das erste und letzte Minimum, entsprechend einer Linie, die ein leeres Gel geliefert hat. Das Gewicht dieser ausgeschnittenen Fläche ist dem Integral unter der Kurve proportional, entspricht jedoch nicht der gesamten aufgetragenen Menge von 100 µg Protein, da das Gel nur einen Teilbereich der aufgetragenen Proteine erfaßt. Niedermolekulare Proteine laufen durch, hochmolekulare bleiben im oder auf dem "Spacergel" zurück.

Im einzelnen wurde folgender Bereich erfaßt:
Min = unterer Grenzwert der erfaßten Proteine
Max = oberer Grenzwert
n = 103

	Min	Max
arithmetischer Mittelwert	18 000	238 000
Standardabweichung	3 600	43 000
Standardfehler	360	4 300

Diese Streuung ist unvermeidlich, da man als Indikator für den Elektrophoreseverlauf die Wanderung des Bromphenolblau benutzt (Albumin befindet sich etwa in der Mitte des Gels, wenn das Blau am unteren Rand des Röhrchens angelangt ist). Da das Bromphenolblau aber je nach der Menge der aufgetragenen Ausgangslösung mehr oder weniger breite Banden liefert, ist eine genau gleich lange Wanderung nicht zu gewährleisten.

12. Bestimmung der GTPR (glomerular-tubular-protein-ratio)

Die GTPR ist das Verhältnis der glomerulär ausgeschiedenen zu den tubulär ausgeschiedenen Proteinen. Dazu wurden die Gewichte beider Flächenanteile auf der Feinwaage gewogen und dividiert. Bei der Bestimmung ergab sich das Problem, wo die Grenze zwischen glomerulären und tubulären Proteinen anzusetzen sei. Dazu fand sich nur bei BOESKEN (2,5) ein Hinweis, der die Albuminbande herausschnitt. Laut Statistik fiel in der vorliegenden Arbeit bei dieser Methode folgender Bereich aus: ($\bar{x} \pm SE$).

Untere Albumingrenze	59 500 ± 320
Obere Albumingrenze	83 500 ± 480

Im Gegensatz zu BOESKEN wurde auf diese Weise das Transferrin (Molekulargewicht 88 000) mitberechnet.
Bei einem ersten Versuch wurde als Grenze der Albumingipfel genommen, durch den das Lot auf die Grundlinie gefällt wurde. Die Ergebnisgerade bei dieser Methode verlief etwas flacher, zeigte aber die gleiche Tendenz. Der flachere Kurvenverlauf ist leicht zu erklären, wenn man bedenkt, daß zu dem jeweils relativ kleinen Gewicht der glomerulären und tubulären Proteine ein ziemlich hoher, annähernd gleicher Albuminanteil addiert wurde, was den Quotienten gegen 1 gehen ließ.

(Beispiel: $\frac{1}{2} = 0{,}5$; $\frac{10+1}{10+2} = \frac{11}{12} = 0{,}91$!)

Ein GTPR-Wert über 1 spricht für eine glomeruläre Schädigung, ein GTPR-Wert unter 1 für eine Tubulopathie.

D. E R G E B N I S S E

1. P r o t e i n a u s s c h e i d u n g

(Bestimmung mit der Lowry-Methode)

Der Sammelurin wurde vor der Konzentrierung mit Albustix (Fa. Amc) auf Proteine geprüft. Alle Urine gesunder Kinder wiesen danach keine Proteinurie auf, ebenso waren 34 Diabetiker negativ. Bei 5 Diabetikern fand sich eine minimale Proteinausscheidung, und nur einer hatte einen deutlich positiven Befund.

Im folgenden werden nur die PEG-konzentrierten Sammelurine verglichen, da die Werte bei der Minicon B_{15}-Konzentration nur ungefähr ein Viertel so hoch und z.T. sogar nicht auszuwerten waren. Entweder reichte die Konzentrierfähigkeit des Gerätes nicht aus oder es blieb zuviel Eiweiß an den Membranen hängen.

a) Ausscheidung an Gesamtprotein in mg/24 Stunden ($\bar{x} \pm SE$)

Gesunde:	95 ± 19 mg/24 Std.
Diabetiker:	124 ± 15 mg/24 Std.

Mit diesen Werten liegen die Diabetiker im Normbereich, da z.B. Albustix erst oberhalb 200 mg/l (entsprechend 200 mg/24 Std. bei 1 l Urinvolumen) positiv werden und als Grenze für den Beginn einer Nephropathie eine Proteinurie von 500 mg/24 Std. angenommen wird. (15)

b) Proteinausscheidung in mg/l ($\bar{x} \pm SE$)

Dieser Wert ist eher ein Maß für die Konzentrationsfähigkeit der Niere, da er ohne Kenntnis des Urinvolumens nichts über die tatsächliche Ausscheidung aussagt. Bei hohem Urin-

volumen können auch bei niedriger Proteinkonzentration im Urin am Tag erhebliche Eiweißmengen ausgeschieden werden. Der Wert betrug

für Gesunde:	185,8 ± 31 mg/l
für Diabetiker:	112,6 ± 11 mg/l

Berücksichtigt man nun das fast doppelt so hohe Urinvolumen der Diabetiker, erklärt sich leicht die höhere Proteinausscheidung pro Tag.
Da bereits in den ersten Jahren nach Manifestation des Diabetes Nierenveränderungen auftreten können, werden die Proteinausscheidungen im folgenden weiter aufgeschlüsselt und für jeden Jahrgang (= Diabetesdauer) getrennt untersucht.

Graphisch ergibt sich folgende Verteilung: (Abb. 5a)
(Zur besseren Übersicht wurden die Mittelwerte jedes Jahrgangs gebildet und mit ihrem jeweiligen mittleren Fehler des Mittelwerts eingetragen. (Abb. 5b)

Dabei zeigt sich ein leichter Anstieg mit der Dauer des Diabetes, wobei in den mittleren Jahrgängen die Werte stark streuen.

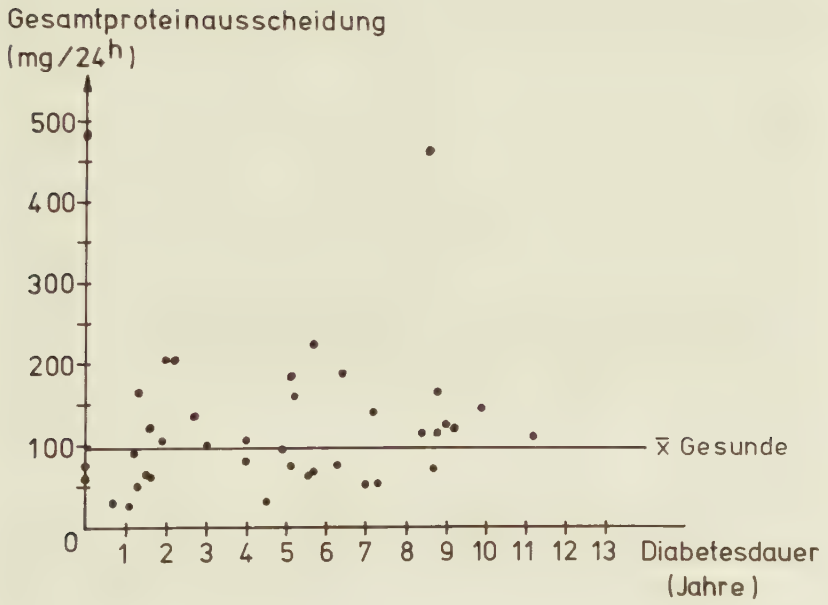


Abb. 5 a: Gesamtproteinausscheidung (mg/24 Std.) in Abhängigkeit von der Diabetesdauer. Verteilung der Einzelwerte. Der Mittelwert der gesunden Kinder ist markiert.

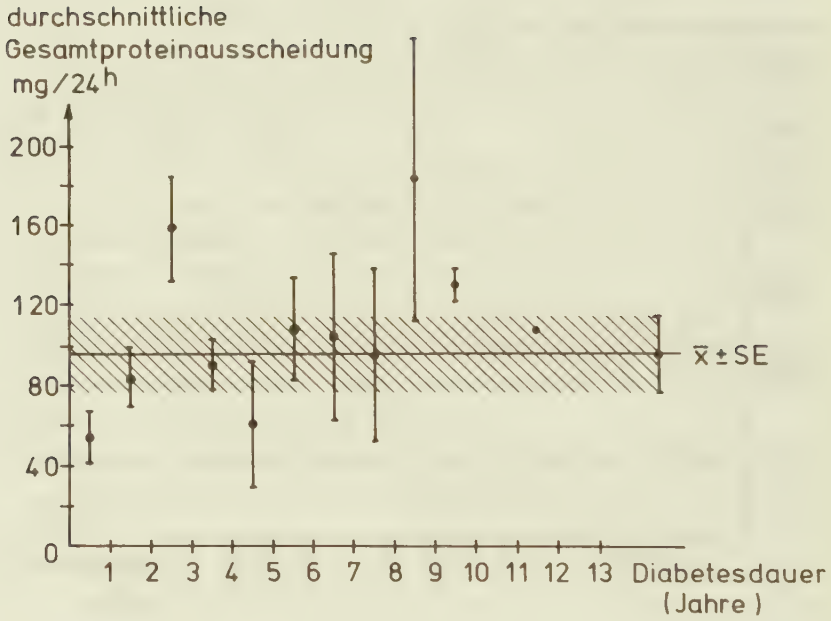


Abb. 5 b: Gesamtproteinausscheidung (mg/24 Std.) in Abhängigkeit von der Diabetesdauer. Mittelwerte pro Jahrgang ($\bar{x} \pm SE$). $\bar{x} \pm SE$ der gesunden Kinder ist schraffiert eingezeichnet.

2. Abhängigkeit der Proteinausscheidung von der Einstellbarkeit des Diabetes mellitus

Als Maß für die Einstellbarkeit wurde die Zeit zwischen zwei stationären Aufenthalten gewählt, berechnet aus der Diabetesdauer in Monaten und der Zahl der Klinikaufenthalte zur Diabeteseinstellung.

Im Durchschnitt lag diese Zahl bei 14,5 Monaten ($\pm$ 1,7 Monate). Trüge man nur die Gesamtproteinausscheidung (mg/24 Std.) gegen diese Zeit auf, könnte man den Einfluß der Diabetesdauer nicht abschätzen, da es z.B. Kinder gibt, die seit 9 Jahren Diabetiker sind und jedes Jahr ein- bis zweimal stationär eingestellt werden müssen. Sie fielen dadurch in dieselbe Spalte mit Kurzzeitdiabetikern (0 bis 2 Jahre), wobei ihre Proteinausscheidung sowohl durch die schlechte Einstellbarkeit als auch durch die Dauer des Diabetes bedingt sein könnte.
Man muß diese Werte also dreidimensional darstellen.

Dazu wurde die Diabetesdauer in Klassen geteilt, um einen besseren Überblick zu gewährleisten.
T_s ist die durchschnittliche Zeit (in Monaten) zwischen zwei stationären Aufenthalten als Maß für die Einstellbarkeit. (Abb. 6)
Man sieht einen unwesentlichen Anstieg im Verlauf des Diabetes, der allerdings auch durch gute Einstellung ($T_s > 25$ Monate) nicht verändert wird. Die größten Schwankungen innerhalb der Einzelwerte finden sich gleich nach Manifestation des Diabetes und bei der längsten Diabetesdauer mit den wenigsten Krankenhausaufenthalten.

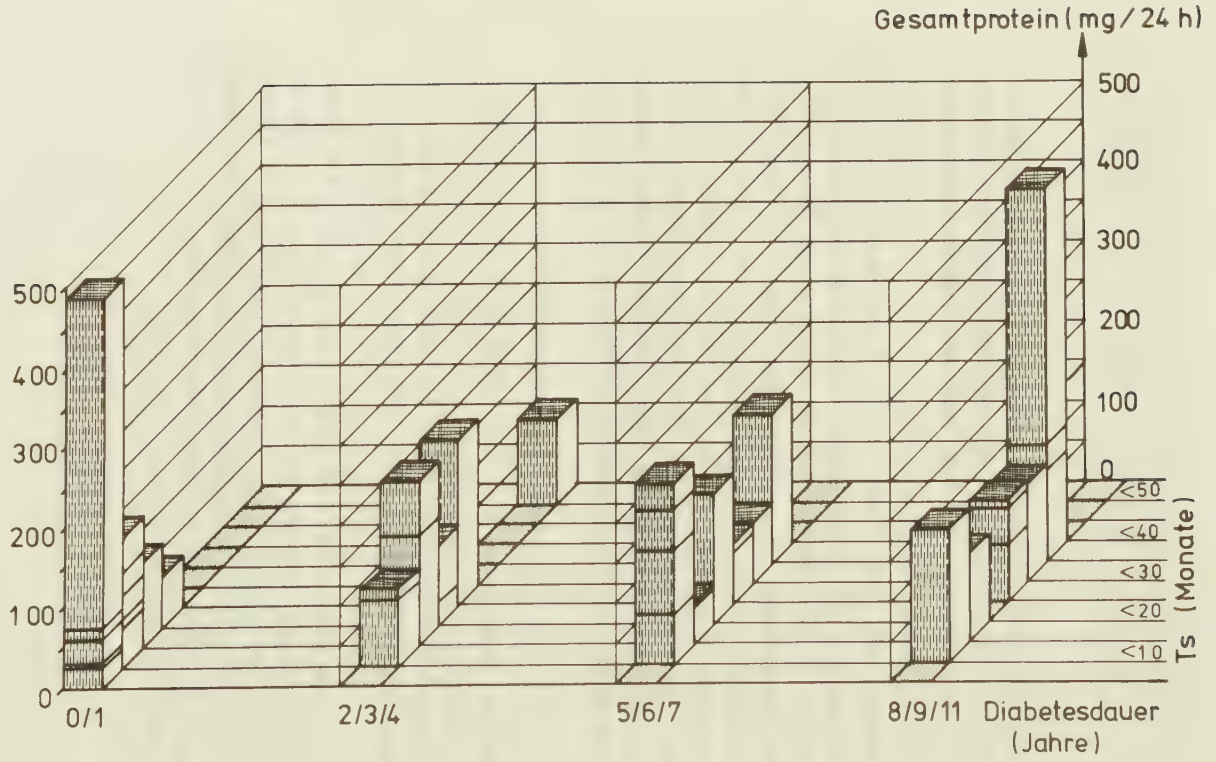


Abb. 6: Abhängigkeit der Gesamtproteinausscheidung (mg/24 Std.) von Diabetesdauer und Einstellbarkeit (n = 40, Einzelwerte in einer Gruppe markiert). Die Diabetesdauer ist der besseren Übersicht wegen in vier Klassen zusammengefaßt, als Maß für die Einstellbarkeit wurde die Zeit zwischen zwei stationären Aufenthalten in Monaten gewählt (T_s, 1 Einheit = 5 Monate).

3. Auswertung der Densitogramme

a) Proteinbanden

Aus jeder densitometrischen Kurve wurde die Anzahl der Proteingipfel oberhalb und unterhalb des Albumins bestimmt. Es ergaben sich folgende Mittelwerte: ($\bar{x} \pm SE$)

	Proteine ⩽ Albumin	Proteine > Albumin
Gesunde	4,2 ± 0,28	4,4 ± 0,27
Diabetiker	4,8 ± 0,17	5,4 ± 0,15

Durchschnittlich lag die Anzahl der Proteinbanden bei den Diabetikern in beiden Molekularbereichen leicht über dem Durchschnitt der Normalpersonen. In Abhängigkeit von der Diabetesdauer konnte folgendes Verteilungsbild der Proteinbanden gefunden werden: (Abb. 7)

Aus dieser Aufstellung läßt sich ersehen, daß bei den Diabetikern fast in jeder Altersgruppe mehr Einzelproteine ausgeschieden werden als bei Gesunden. Diese Ausscheidung ist zu Beginn erhöht, normalisiert sich dann, um mit der Dauer des Diabetes wieder anzusteigen.

b) GTPR (glomerular-tubular-protein-ratio)

Wie bereits erläutert, wurde bei jedem Patienten das Verhältnis der glomerulär ausgeschiedenen zu den tubulär ausgeschiedenen Proteinen gebildet; dabei wurden die beiden verschiedenen Konzentrierungsverfahren (PEG und Minicon B_{15}) getrennt bewertet.

	PEG ($\bar{x} \pm SE$)	Minicon B_{15} ($\bar{x} \pm SE$)
Gesunde	1,05 ± 0,09	0,90 ± 0,03
Diabetiker	0,85 ± 0,08	0,74 ± 0,07

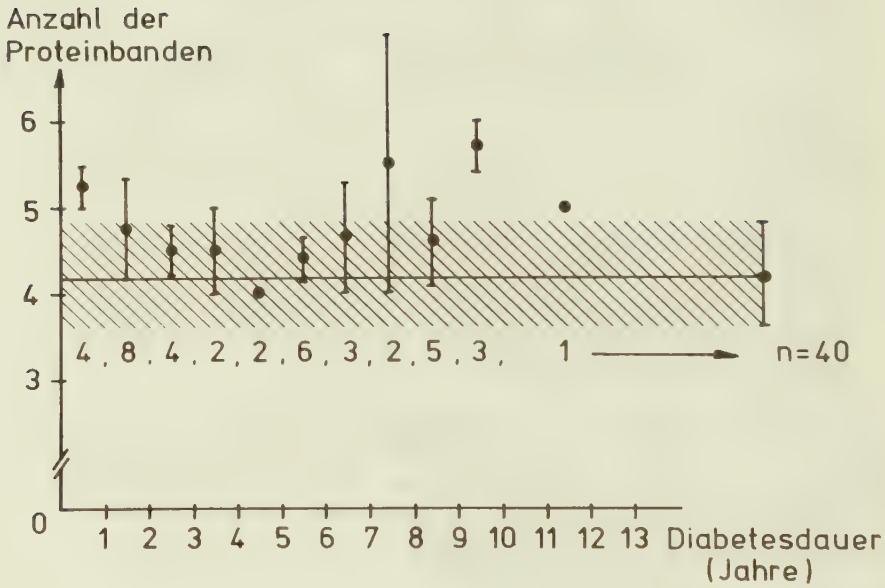


Abb. 7a: Verteilung der Proteinbanden MG < Albumin ($\bar{x} \pm SE$) in Abhängigkeit von der Diabetesdauer. $\bar{x} \pm SE$ der Gesunden ist schraffiert dargestellt.

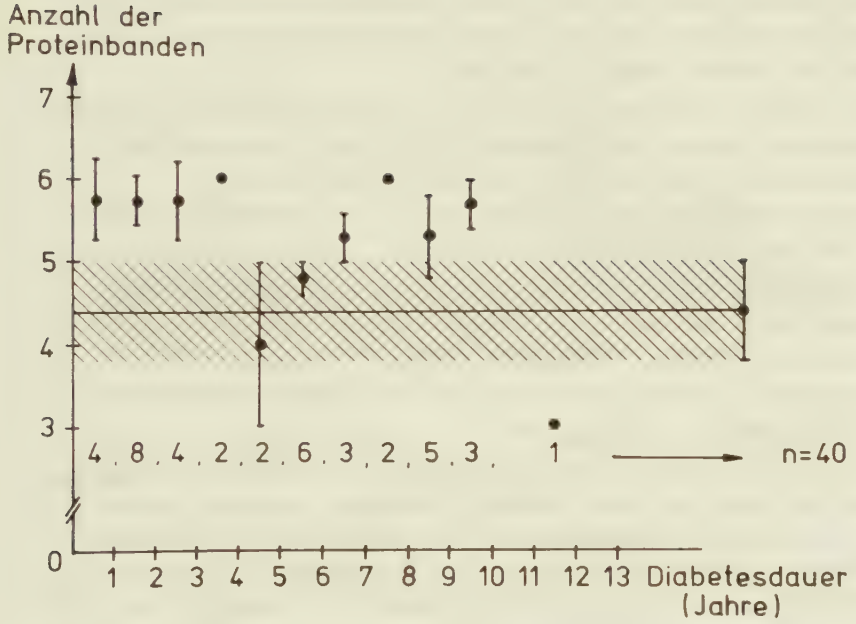


Abb. 7b: Verteilung der Proteinbanden MG > Albumin ($\bar{x} \pm SE$) in Abhängigkeit von der Diabetesdauer.
$\bar{x} \pm SE$ der Gesunden ist schraffiert dargestellt.

Um den bei Diabetikern erniedrigten Mittelwert genauer zu spezifizieren, wurde eine vergleichende Häufigkeitsverteilung der GTPR bei Gesunden und Diabetikern aufgestellt. (Abb. 8)

Während die Minicon B_{15}-konzentrierten Urine der Gesunden nur einen Gipfel im Bereich des Mittelwertes aufweisen, findet sich bei PEG-Konzentration ein weiterer kleiner Gipfel im leicht erhöhten Bereich.

Bei den Diabetikern fallen bei beiden Konzentrationsverfahren zwei Gipfel im erniedrigten (0,4 - 0,6) und erhöhten, aber noch normalen (1,2 - 1,6) GTPR-Bereich auf.
Der Normbereich der Gesunden ist bei den Diabetikern schwächer vertreten.

Betrachtet man die GTPR bei gesunden Kindern in Abhängigkeit vom Lebensalter, so findet sich in allen Altersstufen eine gleichmäßige Schwankung um den Mittelwert, wobei die Minicon B_{15}-konzentrierten Urine eine engere Schwankungsbreite zeigen. (Abb. 9a und b)

Bei den Diabetikern finden sich Werte unterhalb des Normbereichs, die für eine tubuläre Schädigung sprechen, sowie Werte oberhalb der Norm, die eine glomeruläre Schädigung andeuten. Daher erscheint es von Bedeutung, den Einfluß der Diabetesdauer auf diese Veränderungen zu erfahren.(Abb. 10)

Da diese Verteilungen eine absteigende Tendenz erkennen lassen, infolge der Probandenzahlen und der teilweise starken Streuung jedoch unübersichtlich wirken, wurden für jeden Diabetesjahrgang die Mittelwerte gebildet. (Abb. 11)

Daraus erkennt man deutlich den starken Abfall der GTPR mit der Dauer des Diabetes. Der Abfall der Minicon B_{15}-konzentrierten Urine verläuft dabei etwas flacher. Der flachere Kurvenverlauf könnte mit dem Proteinverlust während der Konzentration und der daraus entstehenden Nivellierung der Proteinbanden erklärt werden.

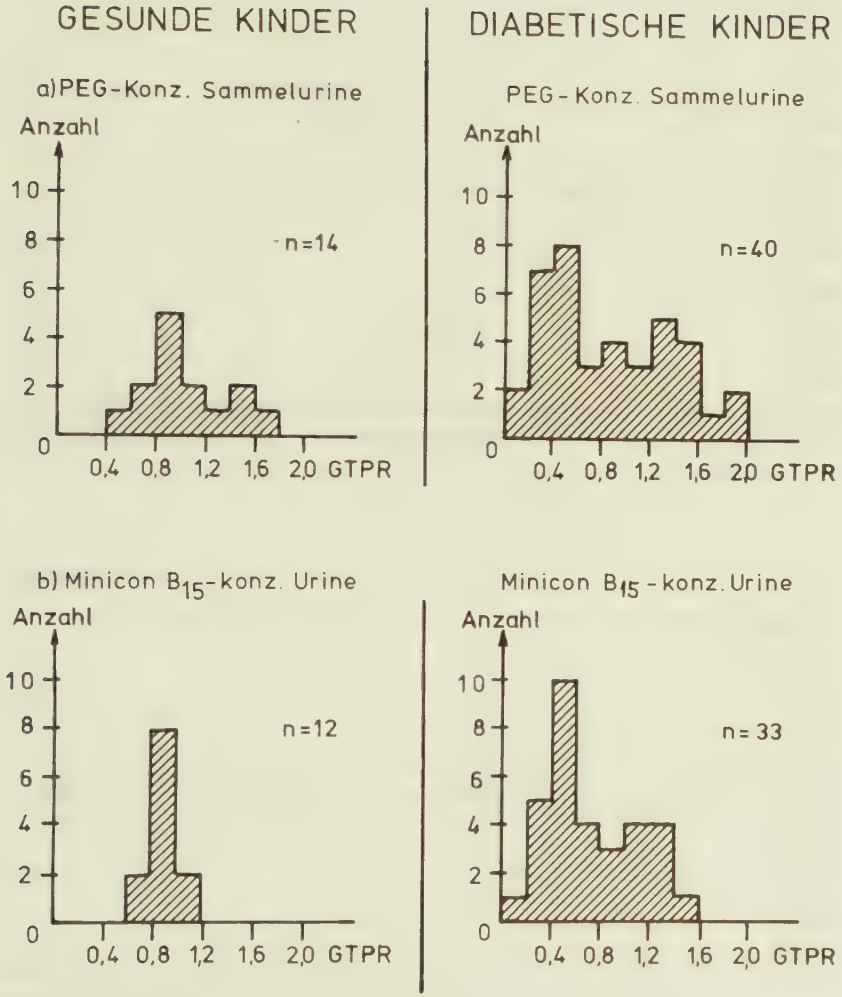
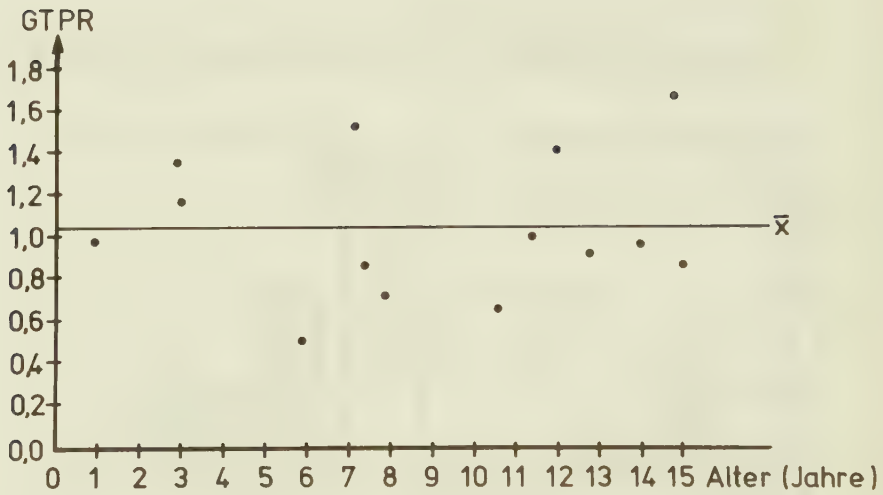


Abb. 8: Häufigkeitsverteilung der GTPR bei Gesunden und Diabetikern, getrennt aufgestellt für PEG- und Minicon B_{15}- Konzentration.

a)



b)

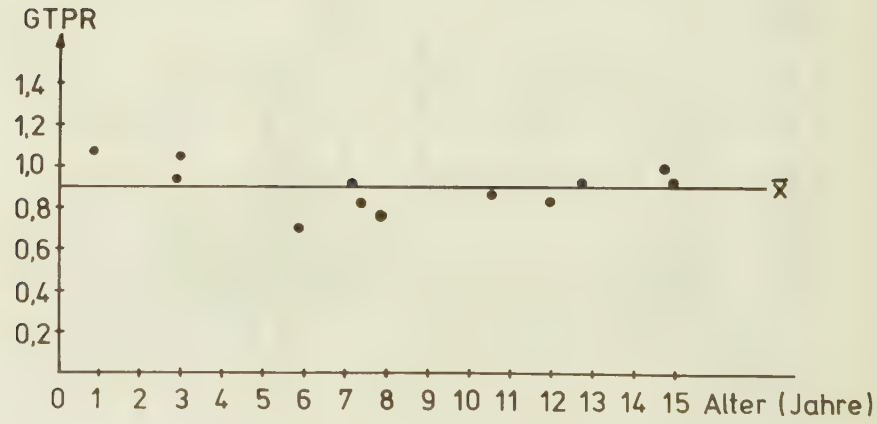
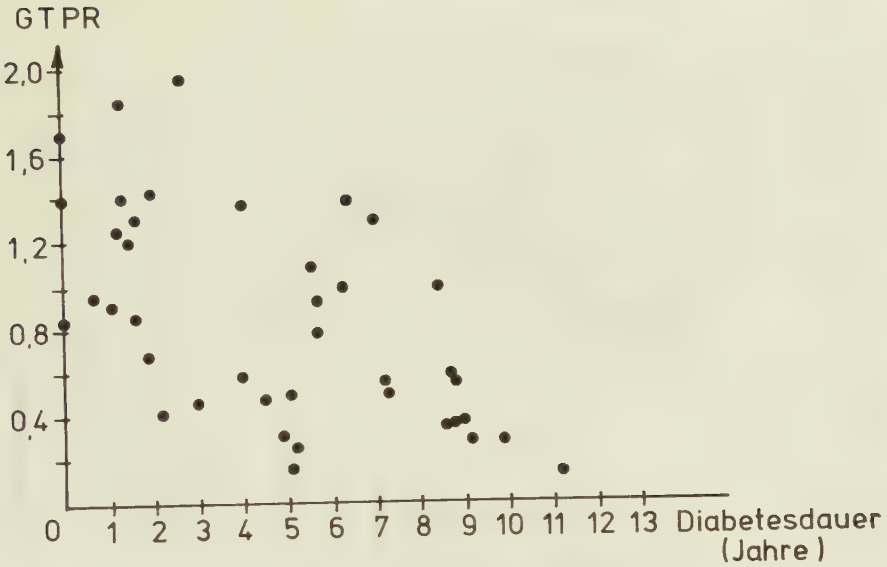


Abb. 9: Verteilung der GTPR bei gesunden Kindern in Abhängigkeit vom Alter:
a) PEG-Konzentration, b) Minicon B_{15}-Konzentration.



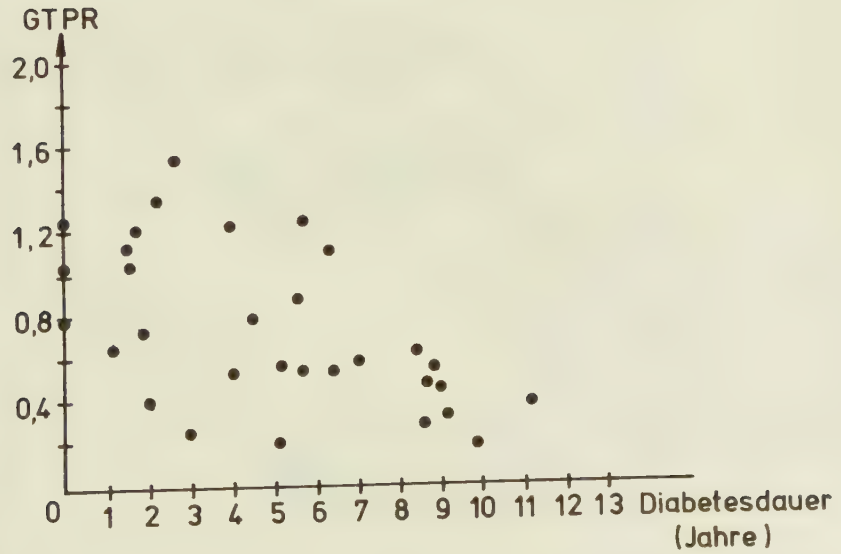


Abb. 10: Abhängigkeit der GTPR von der Diabetesdauer.
a) PEG-Konzentration, b) Minicon B_{15}-Konzentration.

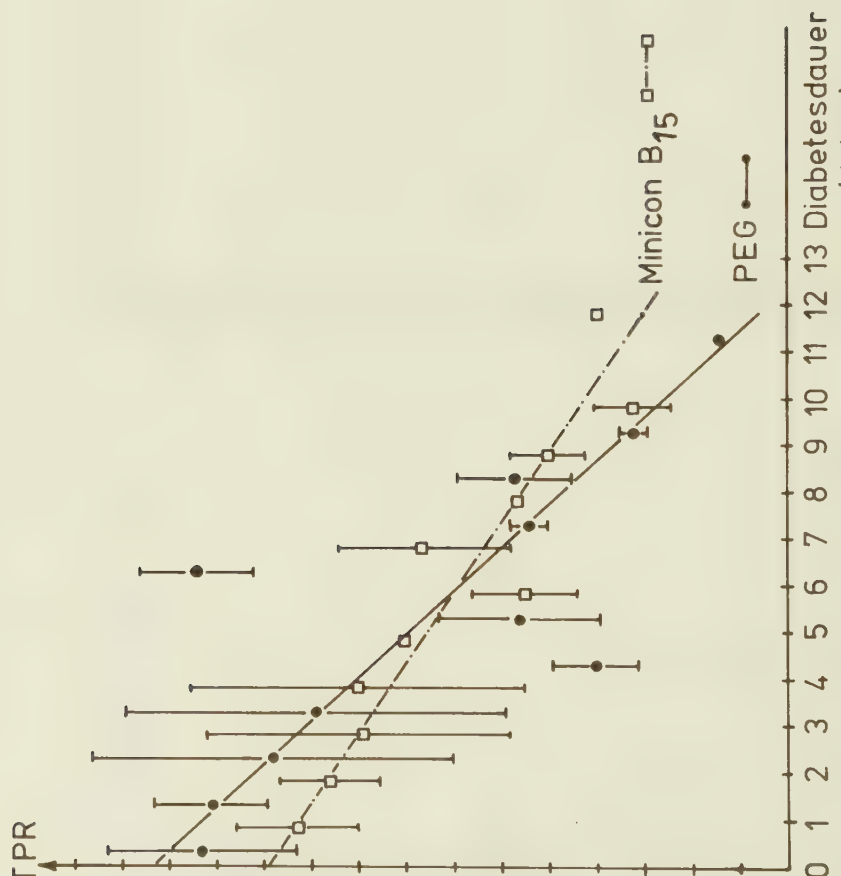


Abb. 11: Mittelwerte der GTPR in Abhängigkeit von der Diabetesdauer ($\bar{x} \pm SE$).

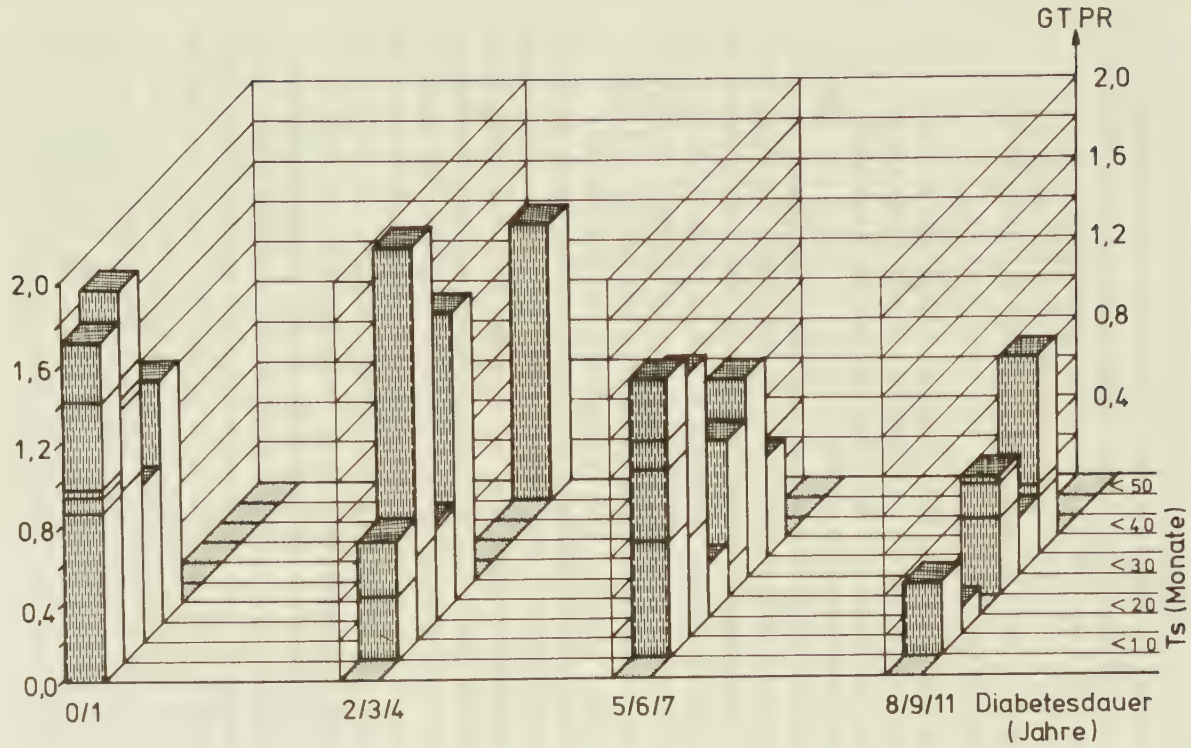


Abb. 12: Abhängigkeit der GTPR von Diabetesdauer und Einstellbarkeit (n = 40, Einzelwerte in einer Gruppe markiert). Die Diabetesdauer wurde wieder in 4 Klassen aufgeteilt, T_s ist die durchschnittliche Zeit zwischen zwei stationären Aufenthalten zur Diabeteseinstellung (in Monaten) als Maß für die Einstellbarkeit.

Zu Beginn des Diabetes liegt die GTPR im oberen Bereich der gefundenen Normwerte, in den folgenden Jahren ist die Streuung am höchsten, da einige Diabetiker bereits nach 2 bis 5 Jahren Krankheitsdauer auf Werte abfallen, die im Durchschnitt erst nach 8 oder 9 Jahren erreicht werden dürften. Nach 8 Jahren hatte nur noch ein Diabetiker eine GTPR im Normbereich.

Untersucht man nun die Abhängigkeit der GTPR von der Einstellbarkeit des Diabetes, muß man die Werte wieder dreidimensional auftragen, da der Einfluß der Diabetesdauer sonst nicht erkennbar ist. (Abb. 12)
Man erkennt ein allgemeines Absinken der GTPR, dabei zeigen die Patienten mit der schlechteren Einstellbarkeit ($T_s < 15$ Monate) im allgemeinen einen schnelleren Abfall. Aber auch in dieser Gruppe finden sich nach 6 Jahren Diabetes noch Normalwerte. Der einzige Patient, der nach 8 Jahren Diabetes noch im Normbereich liegt (Pat. Nr. 10, Tabelle 2), war während seiner gesamten Krankheitsdauer nur zweimal zur Neueinstellung im Krankenhaus und brauchte nie einen Wechsel des Insulins.
Ein anderer Patient (Pat. Nr. 27, Tabelle 2) ist erst seit 2 Jahren Diabetiker, war nur einmal zur Einstellung im Krankenhaus, erhielt die ganze Zeit dasselbe Insulin und liegt trotzdem mit einer GTPR von 0,42 erheblich unter dem Durchschnitt seiner Altersklasse von $1{,}075 \pm 0{,}38$.
Der am schlechtesten einstellbare Patient (Pat. Nr. 25, Tabelle 2, 13 Krankenhausaufenthalte bei 7 Jahren Diabetes) liegt mit einer GTPR von 0,58 zwar tiefer als der Durchschnitt Gesunder, aber noch knapp über dem Durchschnitt seiner Altersgruppe (0,54).

Prozentual ergibt sich folgende Verteilung:
(Der Normbereich liegt zwischen 0,71 und 1,39 ($\bar{x} \pm SD = 1{,}05 \pm 0{,}34$), wobei Werte unter 0,71 für eine Tubulopathie sprechen.)

Diabetesdauer (Jahre)	Anzahl der Patienten	% Tubulopathie (GTPR <0,71)
0 - 1,9	12	0
2 - 4,9	8	62,5
5 - 7,9	11	45,5
> 8	9	88,8

Dieser Befund korreliert sehr gut mit noch unveröffentlichten Befunden von WEBER (Univ.-Kinderklinik Berlin) (44), der mit der Fluoreszenz-Angiographie bei Kindern mit einer Diabetesdauer zwischen 10 und 15 Jahren in 53 % und bei über 15 Jahren in 86 % eine Retinopathie nachweisen konnte.

c) Differenzierung der GTPR-Veränderungen im Verlauf des Diabetes mellitus

Betrachtet man das Proteinmuster gesunder Kinder, so zeigt sich, daß die GTPR mit einem Mittelwert von ungefähr 1 im wesentlichen dadurch bedingt ist, daß neben einer hohen Albuminausscheidung nur ein geringer Anteil anderer Proteine ausgeschieden wird. Dieser ist im glomerulären und tubulären Bereich ungefähr gleich hoch. (Abb. 13)
Tritt nun eine Störung der Nierenfunktion - wie z.B. eine Glomerulonephritis - ein, verändert sich das Bild vollkommen. Es werden fast ausschließlich glomeruläre Proteine ausgeschieden. Die Folge ist ein Anstieg der GTPR auf 14,78. (Abb. 14)
Wie aus der Verteilung der GTPR in Abhängigkeit von der Diabetesdauer zu ersehen war, ist die GTPR zu Diabetesbeginn im oberen Normbereich, um im Krankheitsverlauf dann unter die Norm abzusinken, d.h. zu Beginn werden mehr glomeruläre Proteine ausgeschieden, später überwiegt der tubuläre Anteil. Beide Proteinanteile sollen nun genauer untersucht werden.

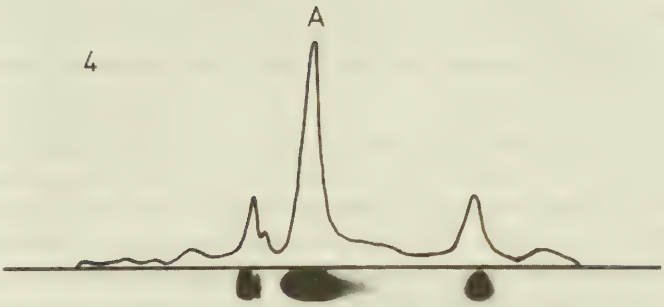


Abb. 13: Patient Nr. 4, Tabelle 3b, F.M., Alter 2.9 Jahre, gesund, GTPR 1,36 - A = Albumin

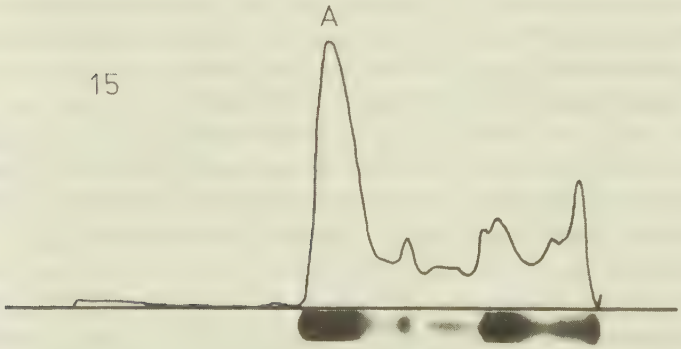


Abb. 14: Patient Nr. 15, Tabelle 3b, M.G., Alter 13.0 Jahre, Glomerulonephritis, GTPR 14,78

In den ersten beiden Jahren nach Diabetesbeginn überwiegt ein Proteingipfel im Bereich 150 000 - 200 000 Dalton, also im Bereich, in dem auch die Immunglobulinbanden zu finden sind. Einige Patienten scheiden zusätzlich noch eine kleinere Proteinmenge im Bereich von 90 000 aus (Transferrin?). Im tubulären Bereich findet sich bei allen ein kleinerer Proteingipfel bei 40 000 Dalton, sowie in der Mehrzahl der Fälle ein noch schwächerer zwischen 25 000 und 30 000 (Retinol-bindendes Protein 21 000, β_2-Glykoprotein 40 000, saures α_1-Glykoprotein 44 000, L-Ketten der Immunglobuline 44 000, α_2-HS-Glykoprotein 49 000, α_1-Antitrypsin 54 000). (Abb. 15)

In den folgenden Jahren sinkt die Ausscheidung der Proteine im Bereich der Immunglobuline auf Werte Gesunder, während sich der Proteingipfel bei 40 000 verstärkt, bei einem Patienten trotz guter Einstellbarkeit bereits nach 2 Jahren. Man darf annehmen, daß es sich dabei um Glykoproteine handelt, zumal deren erhöhter Plasmaspiegel bei Diabetes mellitus bekannt ist. (21) (Abb. 16)

Bei Patienten mit 4 und 5 Jahren Diabetesdauer wird fast keine Proteinurie im Bereich von 150 000 Dalton gefunden, dafür eine breite, zwei- bis dreigipfelige Proteinkurve im Bereich 40 000 bis 50 000, die höher als die Albuminausscheidung ist, sowie ein zweiter ansteigender Gipfel bei 20 000 - 30 000 Dalton. (Abb. 17)

Im 6. und 7. Jahr nimmt die fragliche Immunglobulinausscheidung stark zu, während die tubulären Proteinanteile unter die ausgeschiedene Menge an Albumin absinken. (Abb. 18)

Nach 8 Jahren sind dann die Werte sehr unterschiedlich. Es finden sich vor allem massive tubuläre Proteinurien mit Maxima zwischen 25 000 und 30 000 und bei 40 000, außerdem eine Verbreiterung der Albuminbande mit Betonung des Präalbumins. Im glomerulären Bereich ist eine verstärkte Ausscheidung im Bereich der Immunglobuline zu sehen bei Patienten, deren tu-

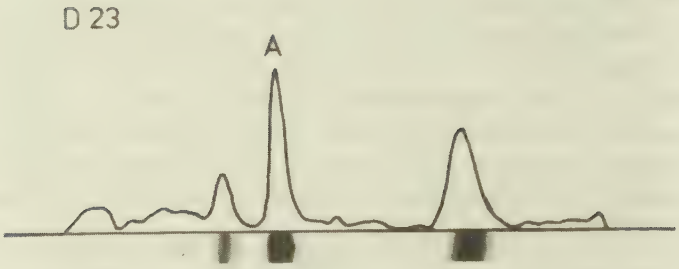


Abb. 15: Patient Nr. D 23, Tabelle 3a, F.H., Alter 6.3 Jahre, Diabetesdauer 1.3 Jahre, GTPR 1,42

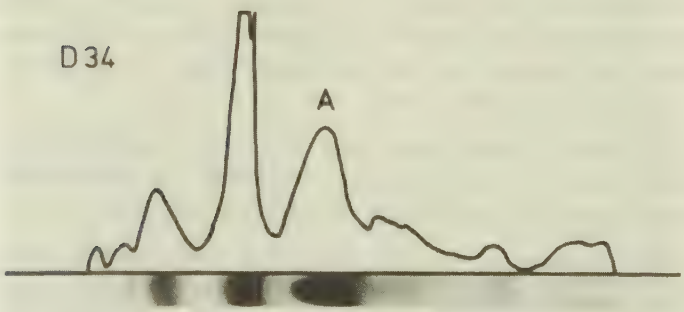


Abb. 16: Patient Nr. D 34, Tabelle 3a, W.B., Alter 14.6 Jahre, Diabetesdauer 2.11 Jahre, GTPR 0,47

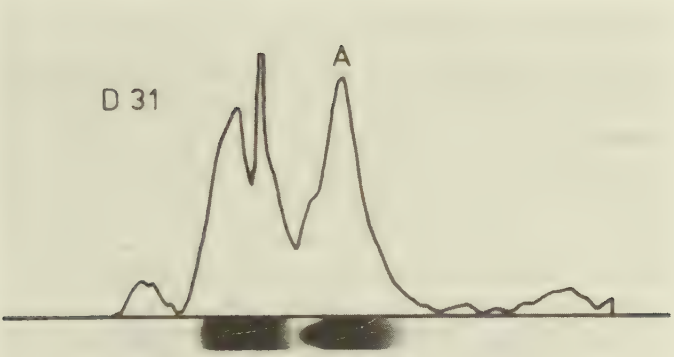


Abb. 17: Patient Nr. D 31, Tabelle 3a, J.R., Alter 5.1 Jahre, Diabetesdauer 5.1 Jahre, GTPR 0,16

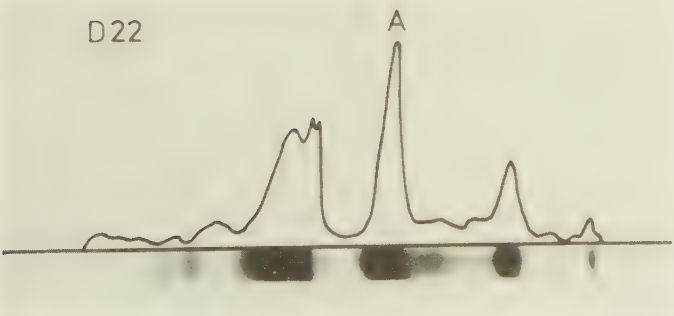


Abb. 18: Patient Nr. D 22, Tabelle 3a, T.S., Alter 10.10 Jahre, Diabetesdauer 7.3 Jahre, GTPR 0,50

buläre Proteinurie nicht wesentlich erhöht ist. Außerdem findet sich ein kleinerer Proteingipfel im Bereich von 90 000 Dalton. (Abb. 19)

Bei den Diabetikern mit der längsten Krankheitsdauer (9 bis 11 Jahre) finden sich schließlich massive tubuläre Veränderungen. Die Ausscheidung im Bereich der Immunglobuline ist gar nicht oder nur schwach erhöht, der Albuminanteil ist oft kleiner als der Proteingipfel bei 40 000 Dalton. Diese Proteinbande teilt sich noch einmal in 2 Anteile. Die zweite tubuläre Proteinbande bei ungefähr 30 000 ist im Vergleich zu früheren Jahrgängen größer geworden und erreicht etwa die Hälfte der ausgeschiedenen Albuminmenge. (Abb. 20)

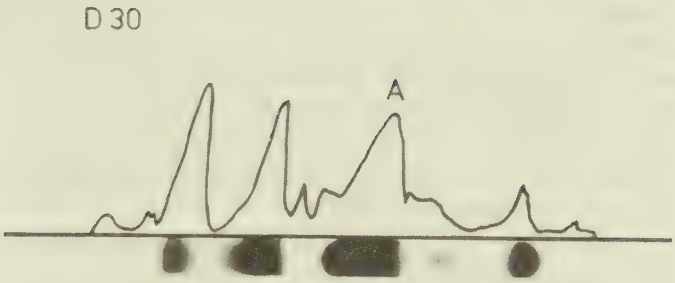


Abb. 19: Patient Nr. D 30, Tabelle 3a, D.S., Alter 13.4 Jahre, Diabetesdauer 8.6 Jahre, GTPR 0,35

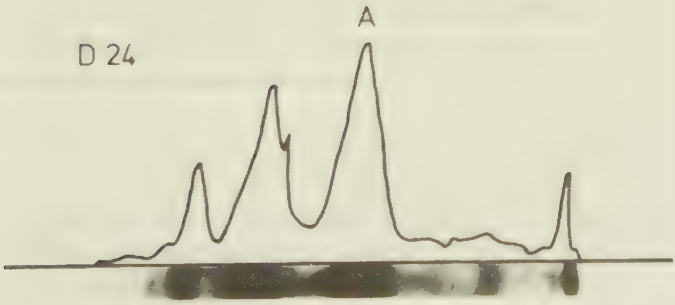


Abb. 20: Patient Nr. D 24, Tabelle 3a, P.E., Alter 15.3 Jahre, Diabetesdauer 9.9 Jahre, GTPR 0,29

E. D I S K U S S I O N

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Frühstadien des kindlichen Diabetes, also mit einer Krankheitsdauer unter 12 Jahren.
Nach einer neueren Untersuchung (18) wurde bei Diabetikern unter 20 Jahren auch nach neun Jahren Diabetes noch keine Glomerulosklerose festgestellt, wobei keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zu erkennen waren. In dieselbe Kategorie fällt die untersuchte Diabetikergruppe, da der älteste Patient 15 Jahre alt war.
Für diesen engen Bereich wurden 40 Patienten gefunden; dies war die Anzahl aller behandelten Fälle in Klinik und Poliklinik der Universitäts-Kinderklinik Würzburg im Verlauf von 15 Monaten (8/1976 - 11/1977).

1. Gesamtproteinausscheidung

Die Gesamtproteinkonzentration im Urin wurde mit einer modifizierten Lowry-Methode (nach STAUFFER (42)) bestimmt, nachdem mit Albustix ein Vortest durchgeführt worden war. Dabei war nur ein Diabetiker deutlich positiv mit 300 mg/l, was gut zu der Tatsache paßt, daß bei keinem Diabetiker in der Anamnese irgendwelche Nierenerkrankungen gefunden werden konnten.

Im Durchschnitt lag die Gruppe der Kontrollkinder bei 95 mg/24 Std., die der Diabetiker bei 124 mg/24 Std.
Dies entspricht durchaus dem Normbereich, da Albustix erst oberhalb 20 mg/100 ml (entspricht 200 mg/24 Std., bei 1 l Urin) positiv werden und als Grenze für den Beginn einer Nephropathie 500 mg/24 Std. angenommen wird. (15)

In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich eine breite Streuung der Werte bei Patienten mit einer Diabetesdauer von 4 - 8

Jahren, wobei die Werte aber stets im Normbereich bleiben. Im Lauf der Krankheit ist eine leichte Zunahme der täglichen Eiweißausscheidung zu erkennen. Dies stimmt mit Literaturangaben (26 - 30) überein, nach denen innerhalb der ersten 10 Jahre nach Diabetesbeginn eine normale basale Albuminexkretion gefunden wird, die aber bei körperlicher Überanstrengung im Gegensatz zu Gesunden gleich doppelt so hohe Werte erreicht. Man erklärt das über eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate (mehr als 25 % höher zu Diabetesbeginn als bei Gesunden (30)) und eine verstärkte tubuläre Reabsorption, die gemeinsam den vermehrten Proteinanfall durch die gestörte Basalmembran verhindern.
Da die Werte nach einer mittellangen Diabetesdauer am stärksten streuen, dürfte man zu diesem Zeitpunkt besonders stark differierende Nierenveränderungen erwarten, je nachdem, wie gut die Stoffwechselstörung unter Kontrolle gehalten werden konnte. Als Maß für die gute Einstellbarkeit die Zeit zwischen zwei stationären Einstellungen zu wählen, erschien als einzige statistisch auswertbare Möglichkeit. Das Problem dabei lag in der Einschätzung der Diabetesentgleisung von seiten der Hausärzte, die sehr unterschiedliche Urinzucker- oder Blutzuckerwerte für behandlungsbedürftig hielten. Aber auch bei guter Einstellbarkeit wird der leichte Anstieg der Proteinausscheidung nicht aufgehalten.

2 Proteinurien fallen besonders auf:
Die eine mit 485 mg/24 Std. wird gleich zu Beginn der Diabetesmanifestation beobachtet, die andere mit 465 mg/24 Std. interessanterweise nach 9 Jahren Diabetes bei wenigen Krankenhausaufenthalten. Beide Fälle könnten durch unerkannte entzündliche Veränderungen bedingt sein, speziell im zweiten Fall aber ist infolge der langen Diabetesdauer eine beginnende Dekompensation wahrscheinlicher. Es ist bekannt (23,7), daß Membranveränderungen durch exakte Insulineinstellung verzögert werden können. Duldet man also beim Patienten einen relativ hohen Blutglucosespiegel, verhindert man zwar einen

hypoglykämischen Schock, schädigt aber frühzeitig die Gefäße. Gerade die geringe Zahl von nur zwei stationären Einstellungen während einer Diabetesdauer von fast 9 Jahren spricht für einen gleichmäßig erhöhten Glucosespiegel. So sind auch die niedrigen Proteinausscheidungen bei Kindern mit häufigen Krankenhausaufenthalten trotz langer Diabetesdauer erklärlich: sie waren knapper eingestellt und gerieten so leichter in eine hypoglykämische Stoffwechsellage. Gleichzeitig aber wurden ihre Nieren weniger geschädigt.

2. GTPR

Die GTPR ist das Verhältnis der glomerulären zu den tubulär ausgeschiedenen Proteinen. Dabei bleibt das Albumin als stets vorhandene Komponente unberücksichtigt. Bei gesunden Kindern ist diese Ausscheidung im allgemeinen bedeutend niedriger als die Albuminausscheidung und ziemlich ausgewogen. So wurde bei den Kontrollkindern bei beiden Konzentrationsverfahren ein Wert um 1 bestimmt, der bei der Urinkonzentration mit der Minicon B_{15}-Methode etwas niedriger lag als bei der PEG-Konzentration. Man könnte dies damit erklären, daß bei dem Konzentrationsvorgang im Minicon B_{15}-Konzentrator doch erhebliche unkontrollierbare Proteinmengen an der Membran haften bleiben. Einzelne Proben waren sogar nicht auswertbar, daraus resultiert die jeweils erniedrigte Patientenzahl bei Minicon B_{15}-Konzentration.
Aus der Abhängigkeitsverteilung der GTPR vom Alter erkennt man bei den Gesunden keine Unterschiede. Die Werte streuen in allen Altersgruppen gleichmäßig um den Mittelwert.

Da der Mittelwert der GTPR bei den Diabetikern deutlich niedriger lag (0,85 PEG bzw. 0,74 Minicon B_{15}), wurde eine Häufigkeitsverteilung aufgestellt, um zu sehen, ob dieser Wert auf eine allgemein niedrigere GTPR zurückzuführen ist. Dabei wurde bei den Gesunden eine Verteilung mit Maximum der Werte

über dem Mittelwert gefunden, während bei den Diabetikern 2 Häufigkeitsgipfel vorlagen (GTPR 0,4 - 0,6 und GTPR 1,2). Der erniedrigte Mittelwert erklärt sich durch die größere Wertezahl im Bereich unterhalb des Mittelwertes Gesunder.

Da Werte unterhalb 1,0 für ein Überwiegen tubulär ausgeschiedener Proteine sprechen, solche über 1,0 für ein Überwiegen glomerulär ausgeschiedener, müssen zwei verschiedene Veränderungen der Proteinausscheidung angenommen werden.

Um dafür weitere Hinweise zu erhalten, wurde die Abhängigkeit der GTPR von der Dauer des Diabetes untersucht. Dabei erkennt man einen starken linearen Abfall der GTPR im Verlauf des Diabetes, wobei die Werte zwischen dem 2. und 4. Krankheitsjahr am stärksten streuen, da einzelne Diabetiker bereits nach 2 Jahren Krankheitsdauer auf Werte abgefallen sind, die im Durchschnitt erst nach 8 Jahren Diabetes erreicht werden. Andererseits liegt nach 8 Jahren Diabetes ein Patient noch im Normbereich gesunder Vergleichskinder. Es scheinen also außer der Dauer noch weitere Faktoren (z.B. immunologische) an der Schädigung der Nieren beteiligt zu sein, wobei in diesem Fall Diabetesdauer mit Hyperglykämie gleichgesetzt wird.

Zur genaueren Untersuchung wurde die Abhängigkeit der GTPR von der Einstellbarkeit und der Diabetesdauer dargestellt. Wie bei der Gesamtproteinausscheidung wurde für die Einstellbarkeit die Zeit zwischen zwei stationären Aufenthalten als Kriterium angenommen, dabei ergaben sich die gleichen Probleme wie bereits beschrieben. Trotzdem zeigt sich in den am schlechtesten einstellbaren Gruppen im Durchschnitt der schnellste Abfall der GTPR, während die Normalwerte häufiger bei den besser einstellbaren Patientenkindern zu finden sind. Es gibt aber in beiden Gruppen auch gegenteilige Werte, z.B. eine GTPR im Normbereich nach 6 Jahren Diabetes trotz ein bis zwei Krankenhausaufenthalten im Jahr und eine sehr niedrige GTPR nach 9 Jahren Diabetes, obwohl das Kind nur alle zwei bis drei Jahre zur Einstellung eingewiesen wurde.

Man kann sich das folgendermaßen erklären: Durch die Hyperglykämie entsteht eine vermehrte osmolare Arbeitslast für die Tubuluszellen. Die erste Reaktion der Niere darauf ist eine Hypertrophie mit verstärkter glomerulärer Filtrationsrate, woraus die erhöhte Proteinausscheidung zu Beginn resultiert. Das Wachstum der renalen Strukturen endet zu einem gewissen Zeitpunkt, vermutlich nach einigen Wochen der Hyperglykämie, wenn ein neues Gleichgewicht erreicht ist (23). Dann setzen Veränderungen der Basalmembranstruktur ein, die zu einem Proteinverlust führen. Gleichzeitig findet aber durch die erhöhte GFR auch eine erhöhte tubuläre Resorption statt (11). Dies ist der Zeitraum der teilkompensierten tubulären Veränderungen, wo man trotz zunehmender Dicke der Basalmembran keine klinische Proteinurie feststellen kann.

Die glomerulären Veränderungen sind dann ein zweiter Krankheitsabschnitt. Diese Veränderungen treten aber erst nach 6 bis 15 Jahren auf, sind in dieser Arbeit also selten faßbar.
Das Problem bei der Diabeteseinstellung liegt darin, daß einerseits ein dauernd erhöhter Glucosespiegel zu Membranveränderungen führt, andererseits aber weniger Insulin zugeführt werden muß, wodurch die glomerulären Veränderungen vielleicht verzögert werden können.

3. Bewertung der einzelnen Proteingipfel

Im ganzen werden von den Diabetikern mehr Proteine ausgeschieden. Bisher wurde nur allgemein ein Abfall der GTPR im Verlauf der ersten 11 Diabetesjahre, bedingt abhängig von der Einstellbarkeit, besprochen. Diese Erniedrigung ist, wie die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, durch ein Überwiegen der tubulär ausgeschiedenen Proteine bedingt. Schon früher wurden bestimmte Klassifizierungen bei verschiedenen Krankheiten beobachtet. Man unterscheidet als Oberbegriff 4 Verteilungsmuster (37):

a) unselektive glomeruläre Proteinurien (60 000 - 1 000 000), bei denen der Schaden an der Basalmembran vermutet wird;

b) selektive glomeruläre Proteinurien (60 000 - 100 000), bei denen Veränderungen der Podozyten und ihrer Haftstellen an der Membran beobachtet werden;

c) unselektive tubuläre Proteinurien (MG < 70 000), die isoliert nur bei kongenitalen Tubulopathien vorkommen, sonst sind sie mit einer schwachen glomerulären Proteinurie gepaart;

d) selektive tubuläre Proteinurien (40 000 - 70 000), meist verbunden mit schwachen glomerulären Proteinurien. Hier wird eine Teilschädigung des Tubulus vermutet.

Die glomeruläre Basalmembran stellt ein spezialisiertes Kollagen dar, das sich vor allem durch seinen hohen Hydroxylysin- und Kohlenhydratgehalt vom fibrillären Kollagen unterscheidet (48). Genau enthält sie Hydroxyprolin, Hydroxylysin und Cystin sowie ungefähr 10 % Kohlenhydrate in Form von 2 verschiedenen Untereinheiten (36):

1) Ein Disaccharid (2 - O - α - D - glucosyl - D - Galactose), das in ß-glykosidischer Bindung an die Hydroxylgruppen von ungefähr 80 % der Hydroxylysinanteile gebunden ist.

2) Ein verzweigtes Heteropolysaccharid aus Sialsäure, Fucose, Galactose, N-acetyl-Glucosamin und Mannose (36,19).

Die Hydroxyaminosäuren Hydroxylysin und Hydroxyprolin werden durch Enzyme aus den genetisch determinierten, ribosomal synthetisierten Polypeptidketten umgewandelt. Diese enthalten Lysin und Prolin (48). In zahlreichen Veröffentlichungen werden typische Basalmembranverdickungen bei Diabetes mellitus beschrieben. Im Hinblick auf diese charakteristische Basalmembranveränderung, wie sie am deutlichsten beim Kimmelstiel-Wilson-Syndrom zutage tritt, erscheint es interessant, daß die Aktivität der Glucosyltransferase in Nierenzellen alloxandiabetischer Ratten deutlich erhöht ist gegenüber Kontrolltieren. Diese Aktivitätssteigerung ist abhängig von der Diabetes-

dauer und kann nur zu Anfang durch Insulinbehandlung verhindert werden (48).
Mit diesen Befunden würde sich erstmals eine biochemisch fundierte Erklärungsmöglichkeit für die beim Diabetes pathologisch vermehrte Basalmembran anbieten. Welche Faktoren für die gesteigerte Aktivität der Glucosyltransferase verantwortlich sind, ist noch nicht bekannt. Denkbar wäre jedoch eine direkte oder indirekte Interaktion der Glucose mit der Regulation der Aktivität dieses und anderer Enzyme der Basalmembranbiosynthese. In diesem Sinne wäre auch die klinische Erfahrung zu verstehen, daß die Häufigkeit des Auftretens von Mikroangiopathien durch besonders sorgfältige Blutzuckereinstellung vermindert werden kann. Über Glucosyltransferase-Hemmstoffe und ihre mögliche therapeutische Wirkung im Tierversuch ist bisher nichts berichtet.
Außerdem findet sich in der Basalmembran ein weiterer Unterschied in der chemischen Zusammensetzung. Die Membranen der Diabetiker weisen gegenüber Gesunden einen erniedrigten Cystingehalt auf (36) und einen erhöhten Gehalt von Hydroxylysin und den daran gebundenen Disacchariden (48,36,19). Dies deutet darauf hin, daß beim Diabetes eine gesteigerte Hydroxylierung von Lysinresten der Basalmembran stattfindet, wodurch die Zahl der Anheftungsstellen für den Zucker erhöht wird. Eine Überproduktion dieser kohlenhydratreichen Untereinheiten könnte die normale Anordnung der Peptidketten des Glucoproteins stören. Dadurch würden fehlerhafte Membranstrukturen entstehen, die ihre normale Funktion nicht mehr erfüllen könnten (48). Diese Membranstruktur wird ebenso durch die Cystinabnahme verändert, denn Cystin sorgt über Disulfidbrücken für eine Quervernetzung der Untereinheiten. Bei seinem Fehlen entsteht eine erhöhte Permeabilität für große Moleküle (36).

Betrachtet man nun die Proteinverteilungen der untersuchten diabetischen Kinder, so zeigt sich zu Beginn der Erkrankung ein Überwiegen der glomerulären Proteine, wahrscheinlich durch eine verstärkte Immunglobulinausscheidung hervorgerufen. Zu-

sätzlich besteht bei einigen Patienten ein starker Proteingipfel im Bereich von 90 000 Dalton. Bei der Erstellung von Eichkurven mit bekannten Proteinen war dies die Stelle des Transferrins. Da u.a. auch ein Autoimmunisierungsvorgang gegen körpereigenes Insulin als Diabetesursache diskutiert wird (43), könnte die Immunglobulinausscheidung darauf zurückzuführen sein. Wahrscheinlicher ist jedoch eine Auflokkerung der gesamten Basalmembranstruktur, da auch vermehrt tubuläre Proteine ausgeschieden werden.
Dennoch sinkt im Laufe der nächsten Jahre die Proteinausscheidung im Bereich der Immunglobuline auf Werte Gesunder, während gleichzeitig der Proteingipfel bei 40 000 ansteigt. In diesem Molekulargewichtsbereich liegen verschiedene Glykoproteine und die L - Ketten der Immunglobuline (21).
Da es nicht wesentlich ist, welches Protein ausgeschieden wird, sondern in welchem Molekulargewichtsbereich es liegt - daraus kann man Rückschlüsse auf den Ort der Nierenveränderungen ziehen -, muß man jetzt von einer fast reinen Tubulusschädigung sprechen.
Es ist bekannt, daß bei schlecht eingestelltem Diabetes Glykogenablagerungen in den distalen Teilen des proximalen Tubulus und den absteigenden Teilen der Henleschen Schleife auftreten (18). Da schon 1933 gezeigt wurde, daß kleine Moleküle proximaler resorbiert werden als große (Lit. s. 4), dürfte eine selektive Ausscheidung von Molekülen der Größenordnung 40 000 - 70 000 für eine Schädigung der distalen Zellen des proximalen Tubulus, hervorgerufen durch Glykogenablagerungen, sprechen.
Dagegen muß eine komplexe Tubulusschädigung angenommen werden, wenn im weiteren Verlauf des Diabetes auch eine verstärkte Ausscheidung kleiner Proteine auftritt. Man erklärt diese einerseits durch das erhöhte Glucoseangebot, das eine Vermehrung der Disaccharideinheiten der Membran induziert, andererseits durch den ungeklärten Abfall der Cystinkonzentration, wodurch weniger Disulfidbrücken zur Vernetzung entstehen. So entsteht ein gelockertes Membrangefüge, durch das größere Moleküle treten können (47).

Wenn sich im weiteren Verlauf des Diabetes die Werte gleichsam in zwei Gruppen teilen lassen, ist das einfach zu erklären. Bei den einen erreichen die tubulären Veränderungen jetzt ihren Höhepunkt, während die anderen dieses Stadium bereits durchlaufen haben und jetzt anfangen, auch glomeruläre Veränderungen zu zeigen. Diese lassen sich an dem Wiederansteigen der Immunglobuline ablesen. Dabei kann man leider keine Abhängigkeit von der Einstellbarkeit entdecken, da dieser Immunglobulinanstieg sowohl bei häufigen wie auch bei seltenen stationären Einstellungen zu finden ist. Andererseits sind aber auch ein dauernd erhöhter Glucosespiegel genau wie starke Schwankungen des Blutzuckerspiegels gleich schädlich, so daß man hier andere Kriterien für die Güte der Einstellung wählen müßte. Die starken Schwankungen der Werte bei längerer Diabetesdauer (trotz allgemein sinkender Tendenz der GTPR) weisen darauf hin, wie stark diese Veränderungen therapeutisch und diätetisch zu beeinflussen, vielleicht aber auch genetisch bedingt sind.
Man müßte gleichzeitig molekulargewichtsbezogene Analysen der Uroproteine, elektronenoptische Untersuchungen von Biopsien und den immunologischen Nachweis einzelner Proteine durchführen, um weiteren Aufschluß über Art, Ort und Zeit der gefürchteten Nierenveränderungen zu erhalten.

Vorliegende Untersuchungen zeigen jedoch klar, daß den glomerulären Veränderungen, die nach einem Zeitraum von 6 Jahren auftreten können, aber auch nach 11 Jahren noch nicht nachweisbar sein müssen, in allen Fällen tubuläre Veränderungen vorausgehen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersucht das Uroproteinmuster bei 40 kindlichen Diabetikern unter 15 Jahren mit einer Krankheitsdauer von maximal 11 Jahren sowie bei einer Kontrollgruppe von 14 gesunden Vergleichskindern. Bei keinem Patienten lagen in der Anamnese oder zum Zeitpunkt der Untersuchung Anzeichen für eine Nierenerkrankung vor, es bestand keine Proteinurie.

Bei allen wurden die Uroproteine konzentriert und mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Danach wurde die GTPR (glomerular-tubular-protein-ratio) bestimmt, das Verhältnis der glomerulär ausgeschiedenen Proteine zu den tubulär ausgeschiedenen. Bei den Kontrollkindern findet sich ein GTPR-Wert um 1, der Normbereich liegt mit 1,05 + 0,34 ($\bar{x} \pm SD$) zwischen 0,71 und 1,39. Werte unter 0,71 sprechen für eine Tubulopathie.

Bei den Diabetikern sieht man mit zunehmender Krankheitsdauer eine signifikante Abnahme der GTPR. Bei einer Diabetesdauer von mehr als 8 Jahren weisen 89 % der Altersgruppe eine Tubulopathie auf. Gelegentliche Normwerte bei kürzerer Krankheitsdauer sind zum Teil dadurch bedingt, daß sich neben den tubulären Veränderungen bereits glomeruläre Veränderungen abspielen, die den Quotienten dann fälschlicherweise normal erscheinen lassen. In diesem Fall ist nur das Densitogramm aussagekräftig. Nach 2 - 5 Jahren Diabetes werden bei 62 % der Patienten tubuläre Veränderungen beobachtet.

Das Ansteigen der Proteinausscheidung vom Molekulargewicht 40 000 bis 70 000 Dalton mit zunehmender Diabetesdauer läßt auf eine fortschreitende Schädigung der Zellen des proximalen Tubulus schließen, wobei zuerst die weiter distal gelegenen betroffen werden. In diesem Tubulusabschnitt sind Glykogenablagerungen bei schlechter Einstellung bekannt, außerdem wird hier das filtrierte Insulin reabsorbiert und abgebaut.

Wenn sich im weiteren Verlauf des Diabetes die Werte gleichsam in zwei Gruppen teilen lassen, ist das einfach zu erklären. Bei den einen erreichen die tubulären Veränderungen jetzt ihren Höhepunkt, während die anderen dieses Stadium bereits durchlaufen haben und jetzt anfangen, auch glomeruläre Veränderungen zu zeigen. Diese lassen sich an dem Wiederansteigen der Immunglobuline ablesen. Dabei kann man leider keine Abhängigkeit von der Einstellbarkeit entdecken, da dieser Immunglobulinanstieg sowohl bei häufigen wie auch bei seltenen stationären Einstellungen zu finden ist. Andererseits sind aber auch ein dauernd erhöhter Glucosespiegel genau wie starke Schwankungen des Blutzuckerspiegels gleich schädlich, so daß man hier andere Kriterien für die Güte der Einstellung wählen müßte. Die starken Schwankungen der Werte bei längerer Diabetesdauer (trotz allgemein sinkender Tendenz der GTPR) weisen darauf hin, wie stark diese Veränderungen therapeutisch und diätetisch zu beeinflussen, vielleicht aber auch genetisch bedingt sind.
Man müßte gleichzeitig molekulargewichtsbezogene Analysen der Uroproteine, elektronenoptische Untersuchungen von Biopsien und den immunologischen Nachweis einzelner Proteine durchführen, um weiteren Aufschluß über Art, Ort und Zeit der gefürchteten Nierenveränderungen zu erhalten.

Vorliegende Untersuchungen zeigen jedoch klar, daß den glomerulären Veränderungen, die nach einem Zeitraum von 6 Jahren auftreten können, aber auch nach 11 Jahren noch nicht nachweisbar sein müssen, in allen Fällen tubuläre Veränderungen vorausgehen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersucht das Uroproteinmuster bei 40 kindlichen Diabetikern unter 15 Jahren mit einer Krankheitsdauer von maximal 11 Jahren sowie bei einer Kontrollgruppe von 14 gesunden Vergleichskindern. Bei keinem Patienten lagen in der Anamnese oder zum Zeitpunkt der Untersuchung Anzeichen für eine Nierenerkrankung vor, es bestand keine Proteinurie.

Bei allen wurden die Uroproteine konzentriert und mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Danach wurde die GTPR (glomerular-tubular-protein-ratio) bestimmt, das Verhältnis der glomerulär ausgeschiedenen Proteine zu den tubulär ausgeschiedenen. Bei den Kontrollkindern findet sich ein GTPR-Wert um 1, der Normbereich liegt mit 1,05 + 0,34 ($\bar{x} \pm SD$) zwischen 0,71 und 1,39. Werte unter 0,71 sprechen für eine Tubulopathie.

Bei den Diabetikern sieht man mit zunehmender Krankheitsdauer eine signifikante Abnahme der GTPR. Bei einer Diabetesdauer von mehr als 8 Jahren weisen 89 % der Altersgruppe eine Tubulopathie auf. Gelegentliche Normwerte bei kürzerer Krankheitsdauer sind zum Teil dadurch bedingt, daß sich neben den tubulären Veränderungen bereits glomeruläre Veränderungen abspielen, die den Quotienten dann fälschlicherweise normal erscheinen lassen. In diesem Fall ist nur das Densitogramm aussagekräftig. Nach 2 - 5 Jahren Diabetes werden bei 62 % der Patienten tubuläre Veränderungen beobachtet.

Das Ansteigen der Proteinausscheidung vom Molekulargewicht 40 000 bis 70 000 Dalton mit zunehmender Diabetesdauer läßt auf eine fortschreitende Schädigung der Zellen des proximalen Tubulus schließen, wobei zuerst die weiter distal gelegenen betroffen werden. In diesem Tubulusabschnitt sind Glykogenablagerungen bei schlechter Einstellung bekannt, außerdem wird hier das filtrierte Insulin reabsorbiert und abgebaut.

Man kann also sicher eine Schädigung der Basalmembran annehmen, da sie das Filter für die ausgeschiedenen Proteine darstellt.

Bei den Patienten, die wegen häufiger Entgleisungen ihres Blutglucosespiegels öfter in stationärer Behandlung waren, fiel die GTPR in der Regel schneller ab, d.h. bei ihnen traten die tubulären Veränderungen früher auf. Es scheint also neben der genetischen Disposition besonders auf die genaue Stoffwechselkontrolle durch Therapie und Diät anzukommen.

G. TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 1: Gesamtproteinausscheidung

a) Diabetiker

lfd. Nr.	Patient	Diabetes-dauer (J.-Mon.)	GTPR	T_s *) (Mon)	24 Std.-Urin-volumen (ml)	Proteinausscheidung (mg) pro 24 h	pro l
D 1	A.H.	11.2	0,14	10	620	109	176
D 2	S.H.	8.8	0,56	21	1450	115	79
D 3	L.W.	0.0	1,40	0	2840	483	170
D 4	M.K.	1.2	1,27	5	660	89	135
D 5	K.L.	2.0	1,44	24	1690	205	121
D 6	P.R.	1.1	0,92	4	780	26	33
D 7	A.N.	0.0	0,84	0	1040	58	56
D 8	A.M.	5.1	0,50	31	1440	185	128
D 9	A.H.	5.7	0,94	6	1310	224	171
D 10	M.S.	8.4	1,00	33	520	116	223
D 11	A.N.	0.0	1,70	0	1300	76	58
D 12	R.V.	8.8	0,36	7	920	163	177
D 13	A.A.	5.6	1,09	7	830	60	72
D 14	W.N.	6.4	1,40	5	2100	190	90
D 15	N.S.	5.7	0,79	22	500	66	132
D 16	B.H.	4.9	0,31	8	1200	93	78
D 17	W.B.	5.2	0,26	16	1150	160	139
D 18	L.K.	3.10	0,59	9	600	78	130
D 19	F.H.	1.3	1,86	5	1130	49	43
D 20	T.F.	1.6	0,86	5	480	60	125

*) T_s = Zeit zwischen zwei stationären Aufenthalten (als Maß für Einstellbarkeit)

lfd. Nr.	Patient	Diabetes-dauer (J.-Mon.)	GTPR	T_s *) (Mon)	24 Std.-Urin-volumen (ml)	Proteinaus-scheidung (mg) 24 h	pro l
D 21	N.S.	6.3	1,00	25	580	74	126
D 22	T.S.	7.3	0,50	10	1780	51	29
D 23	F.H.	1.3	1,42	5	2360	163	69
D 24	P.E.	9.9	0,29	30	960	147	153
D 25	W.N.	7.2	0,58	6	1120	140	125
D 26	P.G.	3.11	1,38	47	690	104	151
D 27	W.B.	2.2	0,42	13	1100	206	187
D 28	D.M.	1.6	1,32	9	2000	118	59
D 29	M.A.	2.7	1,97	10	570	133	233
D 30	D.S.	8.6	0,35	34	1190	463	389
D 31	J.R.	5.1	0,16	20	900	75	83
D 32	S.E.	4.5	0,48	18	590	28	47
D 33	S.B.	0.7	0,96	4	550	28	51
D 34	W.B.	2.11	0,47	18	1440	98	68
D 35	H.W.	1.5	1,21	17	1190	66	55
D 36	S.S.	1.9	0,79	11	1400	104	74
D 37	B.M.	9.2	0,29	28	1510	122	81
D 38	D.M.	9.0	0,38	22	1680	126	75
D 39	B.E.	8.7	0,60	21	1230	68	55
D 40	M.S.	6.10	1,31	14	880	50	57

*) T_s = Zeit zwischen zwei stationären Aufenthalten (als Maß für Einstellbarkeit)

b) Vergleichskinder

lfd. Nr.	Patient	Alter (J.-Mon.)	GTPR	24 Std.-Urinvol. (ml)	Proteinausscheidung mg/24 h	mg/l
1	M.S.	14.8	1,67	2550	196	77
2	B.K.	10.6	0,66	500	257	514
3	M.K.	13.11	0,97	250	34	136
4	M.F.	2.9	1,36	385	54	140
5	C.E.	2.10	1,17	240	76	316
6	A.G.	5.9	0,51	210	34	162
7	M.K.	7.4	0,87	350	61	174
8	J.S.	7.9	0,72	300	53	177
9	K.G.	11.4	1,05	1510	196	130
10	R.R.	14.11	0,87	380	80	211
11	M.K.	0.9	0,98	450	74	164
12	A.S.	7.2	1,53	440	110	250
13	U.H.	12.8	0,93	380	25	66
14	C.B.	12.0	1,41	960	81	84
15	M.G.	13.0	14,78	810	384	474

Glomerulonephritis

Tabelle 2: Anamnese

lfd. Nr.	Patient	Alter (J. - Mon.)	Manifestationsalter	Laufzeit (in Jahren)	Insulinart	Krankenhausaufenthalte (ohne Erstmanifestation) Zahl	Grund	Laufzeit (in Mon.) Zahl d.stat. Aufenthalte + 1 wegen aktueller Untersuchg.
D 1	A.H.	11.4	0.2	11.2	Pankreon, Ultra-Lente	13	fieberhafte Infekte, Schleimstühle	9,57
D 2	S.H.	11.11	3.3	8.8	Depot-Insulin Hoechst	4	Hypoglykämisches Koma	20,8
D 3	L.W.	11.0	11.0	0.0	-	0	(Pseudoperitonitis diabetica)	0
D 4	M.K.	9.7	8.5	1.2	Depot-Insulin Hoechst	2	Entgleisungen	4,66
D 5	K.L.	13.6	11.6	2.0	Depot-Insulin Hoechst	0		> 24
D 6	P.R.	7.11	6.10	1.1	Altins., Dep.-Ins. C R	2	Infektentgleistungen	4,33
D 7	A.N.	3.10	3.10	0.0	Ultra-Lente, Dep.-Ins.	0	(Erstmanifestation)	0
D 8	A.M.	9.10	4.9	5.1	Novolente	1	Entgleisung	30,5
D 9	A.H.	14.8	9.1	5.7	Dep.-Ins. Hoechst	11	Neueinstellungen, Inf.	6,09
D 10	M.S.	10.11	2.7	8.4	Dep.-Ins. Hoechst	2	Neueinstellungen	33,3
D 11	A.N.	3.10	3.10	0.0	Ultra-Lente, Dep.-Ins.S	0	(Erstmanifestation)	0
D 12	R.V.	13.0	4.4	8.8	Dep.-Ins. Hoechst	15	Entgleisungen, Infekte	6,5
D 13	A.A.	9.2	3.8	5.6	Novolente, Dep.-Ins.	8	Entgleisungen bei Inf.	7,33
D 14	W.N.	11.1	4.9	6.4	Dep.-Ins. Hoechst	13	Neueinstellungen, Varicellen, Entgleisg.	5,43
D 15	N.S.	8.10	3.3	5.7	Dep.-Ins. C R Hoechst	2	Neueinstellungen	22,33
D 16	B.H.	6.5	1.8	4.9	Dep.-Ins. Hoechst, Novolente, Novo-Rapitard	6	Neueinstellungen, Infekte	8,14
D 17	W.B.	11.7	6.5	5.2	Dep.-Ins. Hoechst	3	Neueinstellungen	15,5

D 18	L.K.	11.7	7.9	3.10	Dep.-Ins. Hoechst	4	Entgleisungen nach Inf.	9,2
D 19	F.H.	6.3	5.0	1.3	Ultra-Lente Novo	2	Neueinstellungen	5
D 20	T.F.	4.7	3.1	1.6	Ultra-Lente	3	Neueinstellungen	4,5
D 21	N.S.	9.6	3.3	6.3	Dep.-Ins. Hoechst	2	Neueinstellungen	25
D 22	T.S.	10.10	3.7	7.3	Novo-Ultralente, HG CS, Dep.-Ins.	8	Infekte, Entgleisungen	9,66
D 23	F.H.	6.3	5.0	1.3	Ultra-Lente	2	Neueinstellungen	5
D 24	P.E.	15.3	5.6	9.9	Dep.-Ins. Hoechst	3	Neueinstellungen	29,25
D 25	W.N.	11.11	4.9	7.2	Dep.-Ins. Hoechst	13	Neueinst., Entgleisungen, Infekte	6,14
D 26	P.G.	12.5	8.6	3.11	Dep.-Ins. Hoechst	0		> 47
D 27	W.B.	13.9	11.7	2.2	Dep.-Ins. Hoechst	1	Neueinstellung	13
D 28	D.M.	12.3	10.9	1.6	Novo-Rapitard	1	Neueinstellung	9
D 29	M.A.	9.7	7.0	2.7	Dep.-Ins. Hoechst	2	Infekte	10,33
D 30	D.S.	13.4	4.10	8.6	Dep.-Ins. CS	2	Neueinstellungen	34
D 31	J.R.	5.7	0.6	5.1	Novo-Ultralente	2	Neueinstellungen	20,33
D 32	S.E.	5.3	0.10	4.5	Ultra-Lente	2	Hypoglykämie, Neueinst.	17,66
D 33	S.B.	1.5	0.10	0.7	Dep.-Ins. H. CR	1	unverdaute Stühle	3,5
D 34	W.B.	14.6	11.7	2.11	Dep.-Ins. Hoechst	1	Neueinstellung	17,5
D 35	H.W.	9.6	8.1	1.5	Dep.-Ins. Hoechst	0		> 17
D 36	S.S.	13.4	11.7	1.9	Dep.-Ins. Hoechst	1	Hypoglykämie bei Inf.	10,5
D 37	B.M.	11.6	2.4	9.2	HG-Ins. S, später vom Rind	3	Neueinstellungen	27,5
D 38	D.M.	13.1	4.1	9.0	Novo-Rapitard	4	Neueinstellungen	21,6
D 39	B.E.	10.3	1.8	8.7	Dep.-Ins. S	4	Entgleistungen	20,6
D 40	M.S.	8.5	1.7	6.10	Dep.-Ins. Hoechst, Semilente, Novo-Rap.	6	Neueinstellungen, Soordermatitis, Coma diabet.	13,66

Tabelle 3: Auswertung der Densitogramme

a) Diabetiker

lfd. Nr.	Patient	Anzahl der Proteinbanden < Alb	Anzahl der Proteinbanden > Alb	Bereich Min. $\cdot 10^3$	Bereich Max. $\cdot 10^3$	nicht berechn. $\cdot 10^3$	Summe der Integrale (mg) < Alb	Summe der Integrale (mg) > Alb	GTPR PEG (Minicon)	Diabetesdauer	
D 1	A.H.	5	3	17	250	57 - 91	55,4	7,5	0,14	11.2	- PEG
				14	200	63 - 75	20,7	8,1	(0,39)		- Minicon B_{15}
D 2	S.H.	3	4	21	250	56 - 90	31,5	17,6	0,56	8.8	- PEG
				-	-	-	-	-	(-)	-	- Minicon B_{15}
D 3	L.W.	5	6	13	230	54 - 91	24,0	33,5	1,40	0.0	- PEG
				13	210	58 - 79	26,2	27,2	(1,04)		- Minicon B_{15}
D 4	M.K.	6	5	15	220	55 - 89	23,8	30,3	1,27	1.2	- PEG
				15	220	59 - 86	25,8	16,9	(0,66)		- Minicon B_{15}
D 5	K.L.	4	5	19	270	59 - 91	10,3	14,8	1,44	2.0	- PEG
				15	220	63 - 87	23,0	9,7	(0,42)		- Minicon B_{15}
D 6	P.R.	6	6	25	260	58 - 82	27,0	24,8	0,92	1.1	- PEG
				-	-	-	-	-	(-)		- Minicon B_{15}
D 7	A.N.	5	5	16	260	50 - 82	39,3	33,0	0,84	0.0	- PEG
				17	200	63 - 78	9,7	7,8	(0,80)		- Minicon B_{15}
D 8	A.M.	5	5	17	270	59 - 87	27,0	13,4	0,50	5.1	- PEG
				15	190	61 - 81	19,9	10,2	(0,51)		- Minicon B_{15}
D 9	A.H.	6	6	17	260	53 - 95	18,0	16,9	0,94	5.7	- PEG
				13	200	59 - 82	15,0	18,9	(1,26)		- Minicon B_{15}
D 10	M.S.	5	4	17	200	53 - 88	16,3	16,3	1,00	8.4	- PEG
				16	200	60 - 82	27,4	17,4	(0,64)		- Minicon B_{15}
D 11	A.N.	6	7	26	270	58 - 83	29,8	50,7	1,70	0.0	- PEG
				19	200	65 - 76	33,7	42,3	(1,26)		- Minicon B_{15}
D 12	R.V.	5	6	15	260	58 - 87	31,9	11,6	0,36	8.8	- PEG
				16	200	60 - 85	24,2	13,7	(0,57)		- Minicon B_{15}

D 13	A.A.	4	5	21	280	58 - 81	12,6	13,7	1,09	5.6	- PEG
				14	200	63 - 77	12,3	10,9	(0,89)		- Minicon B_{15}
D 14	W.N.	4	5	23	290	60 - 82	28,8	40,4	1,40	6.4	- PEG
				15	200	64 - 76	26,6	14,7	(0,55)		- Minicon B_{15}
D 15	N.S.	4	5	19	270	52 - 95	41,6	32,8	0,79	5.7	- PEG
				16	200	62 - 79	13,0	7,2	(0,55)		- Minicon B_{15}
D 16	B.H.	4	3	16	240	62 - 81	26,2	8,2	0,31	4.9	- PEG
				-	-	-	-	-	(-)		- Minicon B_{15}
D 17	W.B.	5	5	15	220	58 - 82	55,2	14,6	0,26	5.2	- PEG
				17	200	64 - 76	20,0	11,4	(0,57)		- Minicon B_{15}
D 18	L.K.	5	6	19	220	59 - 84	16,7	9,8	0,59	3.10	- PEG
				14	200	63 - 78	31,0	17,2	(0,55)		- Minicon B_{15}
D 19	F.H.	1	4	15	220	64 - 76	12,1	22,5	1,86	1.3	- PEG
				-	-	-	-	-	(-)		- Minicon B_{15}
D 20	T.F.	4	6	22	300	56 - 86	39,9	34,4	0,86	1.6	- PEG
				17	200	64 - 80	12,5	15,2	(1,22)		- Minicon B_{15}
D 21	N.S.	6	6	15	210	58 - 88	13,8	13,8	1,00	6.3	- PEG
				15	180	60 - 84	16,6	18,4	(1,12)		- Minicon B_{15}
D 22	T.S.	7	6	15	220	56 - 81	34,9	17,3	0,50	7.3	- PEG
				-	-	-	-	-	(-)		- Minicon B_{15}
D 23	F.H.	5	6	23	350	62 - 80	20,6	29,2	1,42	1.3	- PEG
				-	-	-	-	-	(-)		- Minicon B_{15}
D 24	P.E.	6	6	18	210	54 - 88	42,2	12,4	0,29	9.9	- PEG
				14	180	64 - 78	66,4	12,3	(0,19)		- Minicon B_{15}
D 25	W.N.	4	6	17	250	57 - 90	25,5	14,9	0,58	7.2	- PEG
				13	190	62 - 78	21,2	11,9	(0,56)		- Minicon B_{15}
D 26	P.G.	4	6	20	250	54 - 96	8,4	11,6	1,38	3.11	- PEG
				18	190	58 - 84	11,3	14,1	(1,25)		- Minicon B_{15}
D 27	W.B.	4	5	17	210	55 - 86	36,0	15,0	0,42	2.2	- PEG
				14	200	50 - 83	10,3	14,1	(1,37)		- Minicon B_{15}
D 28	D.M.	5	6	15	210	59 - 85	14,9	19,7	1,32	1.6	- PEG
				26	320	62 - 78	9,9	10,4	(1,05)		- Minicon B_{15}

lfd. Nr.	Patient	Anzahl der Proteinbanden <Alb	> Alb	Bereich Min. $\cdot 10^3$	Max. $\cdot 10^3$	n. ber. $\cdot 10^3$	Summe der Integrale (mg) <Alb	> Alb	GTPR PEG (Minicon)	Diabetesdauer	
D 29	M.A.	5	6	21	330	54 - 92	12,6	24,8	1,97	2.7	- PEG
				15	220	59 - 89	9,6	15,0	(1,56)		- Minicon B_{15}
D 30	D.S.	6	6	15	210	54 - 76	43,7	15,5	0,35	8.6	- PEG
				15	220	63 - 80	59,0	17,2	(0,29)		- Minicon B_{15}
D 31	J.R.	4	4	21	280	60 - 90	74,5	12,2	0,16	5.1	- PEG
				21	220	59 - 84	38,2	7,9	(0,21)		- Minicon B_{15}
D 32	S.E.	4	5	22	250	60 - 90	21,3	10,3	0,48	4.5	- PEG
				16	220	61 - 79	26,1	21,0	(0,80)		- Minicon B_{15}
D 33	S.B.	5	5	23	300	64 - 77	32,5	31,1	0,96	0.7	- PEG
				-	-	-	-	-	(-)		- Minicon B_{15}
D 34	W.B.	5	7	21	300	56 - 89	49,4	23,1	0,47	2.11	- PEG
				16	220	63 - 80	78,0	20,0	(0,26)		- Minicon B_{15}
D 35	H.W.	6	7	27	270	58 - 88	25,7	31,2	1,21	1.5	- PEG
				21	210	62 - 87	24,8	28,3	(1,14)		- Minicon B_{15}
D 36	S.S.	5	6	21	260	55 - 87	30,5	24,2	0,79	1.9	- PEG
				17	230	60 - 81	34,0	24,9	(0,73)		- Minicon B_{15}
D 37	B.M.	6	5	22	300	56 - 86	40,5	11,9	0,29	9.2	- PEG
				16	220	65 - 84	45,4	14,5	(0,32)		- Minicon B_{15}
D 38	D.M.	5	6	24	270	56 - 87	32,8	12,4	0,38	9.0	- PEG
				14	240	61 - 80	30,0	13,8	(0,46)		- Minicon B_{15}
D 39	B.E.	4	4	21	310	60 - 82	17,6	10,5	0,60	8.7	- PEG
				14	180	61 - 80	13,3	6,4	(0,48)		- Minicon B_{15}
D 40	M.S.	4	5	25	270	56 - 89	15,6	20,5	1,31	6.10	- PEG
				16	190	61 - 83	11,9	7,1	(0,60)		- Minicon B_{15}

b) Vergleichskinder

lfd. Nr.	Patient	Anzahl der Proteinbanden < Alb	> Alb	Bereich Min. $\cdot 10^3$	Max. $\cdot 10^3$	nicht ber. $\cdot 10^3$	Summe der Integrale (mg) <Alb	> Alb	GTPR PEG (Minicon)	Alter	
1	M.S.	3	4	19	280	58 - 82	10,7	17,9	1,67	14.8	gesund
				17	210	64 - 77	17,6	17,5	(0,99)		
2	B.K.	5	4	19	190	59 - 84	20,1	13,2	0,66	10.6	gesund
				22	180	58 - 84	13,1	11,3	(0,86)		
3	M.K.	4	3	20	290	64 - 96	10,2	9,9	0,97	13.11	gesund
				-	-	-	-	-	(-)		
4	M.F.	4	3	20	290	60 - 82	13,7	18,7	1,36	2.9	gesund
				15	200	64 - 78	8,5	8,0	(0,94)		
5	C.E.	3	4	23	300	58 - 89	12,8	15,0	1,17	2.10	gesund
				21	250	60 - 90	13,1	13,7	(1,05)		
6	A.G.	5	5	15	210	58 - 82	18,0	9,1	0,51	5.9	gesund
				24	210	60 - 82	25,9	18,0	(0,69)		
7	M.K.	5	5	15	230	58 - 85	22,9	20,0	0,87	7.4	gesund
				17	210	62 - 78	31,0	25,3	(0,82)		
8	J.S.	6	6	20	210	59 - 84	17,8	12,8	0,72	7.9	gesund
				25	210	62 - 78	17,9	13,6	(0,76)		
9	K.G.	4	5	19	340	57 - 82	28,0	29,5	1,05	11.4	gesund
				-	-	-	-	-	(-)		
10	R.R.	4	5	17	220	55 - 82	33,4	28,9	0,87	14.11	gesund
				22	220	62 - 78	18,0	16,5	(0,92)		
11	M.K.	5	6	24	350	62 - 79	41,7	41,0	0,98	0.9	gesund
				25	360	63 - 82	41,0	43,8	(1,07)		
12	A.S.	2	3	23	280	59 - 88	9,2	14,1	1,53	7.2	gesund
				17	200	62 - 82	13,2	12,2	(0,92)		
13	U.H.	4	5	27	300	60 - 82	10,7	10,0	0,93	12.8	gesund
				20	210	63 - 79	12,3	11,3	(0,92)		
14	C.B.	5	4	23	320	59 - 84	13,8	19,5	1,41	12.0	gesund
				14	180	58 - 88	12,3	10,2	(0,83)		
15	M.G.	0	8	19	250	55 - 83	3,2	47,3	14,78	13.0	Glomerulo-nephritis
				18	240	58 - 87	5,7	25,7	4,51		

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. D. Gekle für die Überlassung des Themas und die unermüdliche Beratung während der Arbeit und bei der Zusammenstellung der Ergebnisse.

Dem Leiter der Klinik, Herrn Professor Dr.Dr.h.c. J. Ströder, danke ich für die Übernahme des Korreferats und die Arbeitsmöglichkeiten im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. Thanner, der mich in die Laborarbeiten einführte und mir während der praktischen Untersuchungen stets beratend zur Seite stand.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. BLEKER, J.: Die Geschichte der Nierenkrankheiten. Mannheim: Boehringer 1972

2. BOESKEN, W.H., KOPF, K. u. P. SCHOLLMEYER: Differentation of proteinuric diseases by discelectrophoretic molecular weight analysis of urinary proteins. Clin. Nephrol. 1, 311 - 318 (1973)

3. BOESKEN, W.H., SCHMIDT, M. u. P. SCHOLLMEYER: Differenzierung proteinurischer Erkrankungen durch die diskelektrophoretische Analyse der Uroproteine. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79, 782 - 785 (1973)

4. BOESKEN, W.H.: Die tubuläre Proteinurie. Klin. Wschr. 53, 473 - 479 (1975)

5. BOESKEN, W.H.: Molekulargewichtsbezogene Analyse der Proteinurie als Beitrag zur Diagnose renaler Erkrankungen. Med. Klin. 71, 441 - 448 (1976)

6. BORGEAUD, M., PAUNIER, L. u. L.M. HUMAIR: La β_{1c}-globuline dans les néphropathies de l'enfant. Helv. paediat. Acta 39, 585 - 601 (1970)

7. CAHILL, G.F.: Metabolic problems in long-standing insulin-dependent diabetic patients. Kidney Int. 8 (Suppl.), 47 - 50 (1974)

8. CONTRACTOR, B.Z. u. B.P. CHAKRAVORTI: A profile of urinary proteins by disc-electrophoresis. Indian. J. Med. Sci. 7, 452 - 454 (1973)

9. FONSECA-WOLLHEIM, E. da u. H.-J. ROHWEDDER: Quantitative und qualitative Untersuchungen über die physiologische Harnproteinausscheidung bei Kindern. Arch. Kinderheilk. 183, 122 - 128 (1971)

10. GEKLE, D.: Zur Pathogenese der Proteinurie beim nephrotischen Syndrom und ein Erklärungsversuch der Hypercholesterinämie. Monatsschr. Kinderheilk. 115, 161 - 163 (1967)

11. GEKLE, D., JANOVSKÝ, M., ŠLECHTOVÁ, R. u. J. MARTINEK: Einfluß der glomerulären Filtrationsrate auf die tubuläre Glucosereabsorption bei Kindern. Klin. Wschr. 45, 416 - 419 (1967)

12. GEKLE, D.: Pathophysiologie glomerulärer Nierenerkrankungen. Monatsschr. Kinderheilk. 117, 336 - 342 (1969)

13. GEKLE, D., KULT, J., HÜTTIG, H. u. A. HEIDLAND: $ß_2$-Mikroglobulin bei gesunden und nierenkranken Kindern. Z. Kinderheilk. 119, 293 - 298 (1975)

14. HEDDRICK, J.L. u. A.J. SMITH: Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126, 155 - 164 (1968)

15. HEMMINGSEN, L., HØIBY, N. u. P. KRAGH-SØRENSEN: Protein and LDH-isoenzyme pattern of the urine from patients with diabetes mellitus, determined by disc-electrophoresis. Diabetes 6, 512 - 518 (1970)

16. HEMMINGSEN, L. u. P. SKAARUP: Urinary excretion of ten plasma proteins in patients with febrile diseases. Acta Med. Skand. 201, 359 - 364 (1977)

17. HOFFMEISTER, H. u. K.H. SCHÜTT: Diagnostische Verwendbarkeit der Polyacrylamid-Elektrophorese. Dtsch. Med. Wschr. 97, 1464 - 1466 (1972)

18. IRMSCHER, K.: Diabetische Nierenerkrankungen. Klinikarzt 7, 58 - 72 (1978)

19. KALANT, N., SATOMI, R., WHITE, R. u. E. TEL: Changes in renal glomerular basement membrane with age and nephritis. Can. J. Biochem. 55, 1197 - 1206 (1977)

20. KIMMELSTIEL, P. u. C. WILSON: Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. Amer. J. Path. 12, 83 - 98 (1936)

21. KULT, J.: Bedeutung quantitativer Plasmaproteinbestimmung in Diagnostik und Therapie nephrologischer Erkrankungen. Habilitationsschrift, Würzburg (1975)

22. LAMBIN, P., ROCHU, D. u. J.M. FINE: A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gradient gel. Anal. Biochem. 74, 567 - 575 (1976)

23. LUNDBAEK, K.: Diabetische Angiopathie. Münch. Med. Wschr. 119, 647 - 654 (1977)

24. MAURER, H.R.: Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Berlin: de Gruyter 1971

25. MAURER, H.R. u. R.C. ALLEN: Useful buffer and gel systems for polyacrylamide gel electrophoresis. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 10, 220 - 225 (1972)

26. MOGENSEN, C.E.: Kidney function and glomerular permeability to macromolecules in early juvenile diabetes. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28, 79 - 90 (1971)

27. MOGENSEN, C.E.: Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term and long-term juvenile diabetes mellitus. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28, 91 - 100 (1971)

28. MOGENSEN, C.E.: Urinary albumin excretion in early and long-term juvenile diabetes. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28, 183 - 193 (1971)

29. MOGENSEN, C.E.: Glomerular filtration rate and renal plasma flow in long-term juvenile diabetics without proteinuria. Brit. Med. J. 4, 257 - 259 (1972)

30. MOGENSEN, C.E. u. E. VITTINGHUS: Urinary albumin excretion during exercise in juvenile diabetes. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 35, 295 - 300 (1975)

31. MULLI, J.C., BALANT, L., GIROMINI, M. u. J. FABRE: Analysis of proteinuria in health and disease using sodium dodecyl sulfate-acrylamide gel electrophoresis. Europ. J. Clin. Invest. 4, 253 - 259 (1974)

32. PESCE, A.J., BOREISHA, I. u. V.E. POLLAK: Rapid differentiation of glomerular and tubular proteinuria by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
Clin. Chim. Acta 40, 27 - 34 (1972)

33. PESCE, A.J., HSU, A., KORNHAUSER, C., SETHI, K., OOI, B.S. u. V.E. POLLAK: Method for measuring the concentration of urinary proteins according to their molecular size cathegory.
Clin. Chem. 22, 667 - 672 (1976)

34. PIRES, M.T., SANTINHO da CUNHA, A., VIRELLA, G. u. J. SIMÕES: Analytical characterization of urinary proteins by sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis in renal disease.
Nephron 14, 361 - 372 (1975)

35. POWELL, H.R.: Relationship between proteinuria and ephithelial cell changes in minimal lesion glomerulopathy.
Nephron 16, 310 - 317 (1976)

36. RASKIN, P.: Diabetic regulation and its relationship to microangiopathy.
Metabolism 27, 235 - 252 (1978)

37. RAUTENSTRAUCH, H.: Urinproteinanalysen mit der Diskelektrophorese: Ein Verfahren zur Differentialdiagnose von Nierenerkrankungen.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 333 - 337 (1977)

38. REICHEL, W., WOLFRUM, D.I., KLEIN, R. u. F. SCHELER: Differenzierung der Proteinurie durch die Mikroelektrophorese in kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradientengelen.
Klin. Wschr. 54, 19 - 24 (1976)

39. REUBI, F.: Nierenerkrankungen bei Diabetes mellitus.
Med. Welt 25, 1667 - 1673 (1974)

40. SHAPIRO, A.L., VIÑUELA, E. u. E. MAIZEL: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Research Comm. 28, 815 - 820 (1967)

41. SHIBATA, S. u. T. NAGASAWA: Glycoproteinuria as an indicator of glomerular basement membrane damage.
J. Lab. Clin. Med. 89, 207 - 216 (1977)

42. STAUFFER, E.: A linear standard curve for the Folin Lowry determination of protein.
Analyt. Biochem. 69, 646 - 648 (1975)

43. VERLOHREN, H.-J., FUCHS, U. u. D. LOHMANN: Diabetische Glomerulosklerose - Folge der Insulinbehandlung?
Zschr. Inn. Med. 28, 341 - 345 (1973)

44. WEBER, B.: (persönliche Mitteilung)

45. WEBER, K. u. M. OSBORN: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412 (1969)

46. WESTBERG, N.G. u. A.F. MICHAEL: Immunohistopathology of diabetic glomerulosclerosis.
Diabetes 21, 163 - 174 (1972)

47. WESTBERG, N.G. u. A.F. MICHAEL: Human glomerular basement membrane: Chemical composition in diabetes mellitus.
Acta Med. Scand. 193, 1 - 9 (1973)

48. WIELAND, O.H.: Zur Pathobiochemie des diabetischen Spätsyndroms.
Med. Klin. 69, 1417 - 1423 (1974)

L e b e n s l a u f

Am 25. April 1954 wurde ich als Tochter des Versicherungskaufmanns Erwin Kastrup und seiner Ehefrau Elisabeth Christine, geborene Lersch, in Dortmund geboren.

Auf Grund beruflicher Verbesserung meines Vaters zum Bezirksdirektor zogen wir 1963 nach Ulm und 1966 nach Regensburg, wo ich im Mai 1973 das Abitur am humanistischen Albertus-Magnus-Gymnasium ablegte.

Im Oktober 1973 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Regensburg, nach der Ärztlichen Vorprüfung im August 1975 wechselte ich nach Würzburg. Dort bestand ich 1976 den Ersten Teil, 1978 den Zweiten Teil und 1979 den Dritten Teil der Ärztlichen Prüfung. Die Approbation erhielt ich am 28. November 1979.

Am 13. Juli 1979 heiratete ich den Arzt Thomas Nebinger aus Neuburg an der Donau, der an der Taubertalklinik in Bad Mergentheim beschäftigt ist.

Würzburg, den 8. Januar 1980

Dagmar Nebinger

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80